

Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 8

Kraków, wrzesień 2015

Zespół redakcyjny

Agnieszka Seretny

Agata Kalita
Jan Majta
Patryk Motyka
Róża Pietrzycka
Igor Tomczyk
Krzysztof Ufir

Okładka

Jan Majta

Skład

Jan Majta

Wydawca

KNSB Mygen

Nakład 350 szt.

Kontakt

aga.seretny@gmail.com

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez:



RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIwersYTETU
JAGIELLOŃSKIEGO

Od redakcji

DRODZY CZYTELNICY!

Witamy Was na łamach ósmego numeru naszych Zeszytów Naukowych. Po raz kolejny udało nam się poszerzyć nasz zasięg, co zaowocowało napływem jeszcze większej liczby artykułów z całej Polski. Będziecie mogli dzięki temu zapoznać się z publikacjami o bardzo rozległej tematyce. Część z publikowanych przez nas artykułów powstało na podstawie referatów wygłoszonych podczas I Studenckiej Konferencji Genetycznej „Genomica” współorganizowanej przez członków naszego Koła wraz z Kołem Naukowym Genetyki UJ.

Życzymy miłej lektury!

Spis treści:

Agnieszka Kiełbasa	
Tajemnice zapłodnienia in vitro	5
Ewa Banach	
Rola mikroRNA w zaburzeniach afektywnych	11
Agnieszka Bodzioch	
Zaburzenia liczby i funkcji komórek NK u ludzi	20
Iwona Kowalczyk	
Jak science wspomaga fiction, czyli w jakim stopniu technologie inżynierii genetycznej przybliżyły wizję de-ekstynkcji.	31
Daniel Krochmal	
Chemeryna: pomost pomiędzy metabolizmem a odpornością	39
Paweł Krzyżek	
Prozdrowotny wpływ flory bakteryjnej na organizm człowieka	45
Katarzyna Sitarz	
Białka MDM2, MDMX i p53 oraz znaczenie ich interakcji w nowotworzeniu i terapii przeciwnowotworowej	54
Julia Sławianowska	
Roślinne dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych	59
Wiktor Jerzy Tokarek	
Ciało prolamellarne - niezwykła struktura komórki roślinnej	68
Joanna Włodek	
Rola oksygenazy hemowej 1 w odpowiedzi na G-CSF, podawany u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, z powodu neutropenii indukowanej chemioterapią	74
Przemysław Dutka	
Synteza funkcjonalnych nanocząstek magnetycznych, charakterystyka spektroskopowa oraz ocena potencjalnego zastosowania w procesie oczyszczania białek	84

Tajemnice zapłodnienia in vitro

Agnieszka Kiełbasa, Dorota Sabat, Katarzyna Wilczak

Koło Naukowe Embriologii

Wydział Biologii

Mianem „in vitro” określa się zapłodnienie, które przeprowadza się poza drogami rodnymi kobiety. Jest to technika wspomaganego rozrodu, która wzbudza obecnie w Polsce wiele kontrowersji m.in. z powodu problemów natury etycznej i moralnej. Jednak dla niektórych par zmagających się z bezpłodnością, zapłodnienie in vitro może okazać się jedyną szansą na posiadanie własnego dziecka. Procedurę zapłodnienia in vitro można podzielić na cztery etapy. Pierwszy z nich – stymulacja hormonalna, skutkuje rozwojem w jajnikach kilku pęcherzyków Graffa jednocześnie. Uzyskuje się z nich od pięciu do dziesięciu dojrzałych oocytów, podczas gdy w naturalnie zachodzącej owulacji dojrzewa zwykle tylko jeden. W drugim etapie oocyty pobierane są laparoskopowo. Następnie, przeprowadzane jest zapłodnienie w warunkach laboratoryjnych, a powstałe zarodki są przenoszone do macicy kobiety.

Metody

Mało kto wie, że określenie „zapłodnienie in vitro” odnosi się tak naprawdę do czterech różnych odmian tej metody leczenia niepłodności. Kryją się one pod tajemniczymi nazwami: IVF, ICSI, PZD i SUZI. Ale co to tak właściwie znaczy?

IVF (z ang.: in vitro fertilization – zapłodnienie in vitro) to najstarsza odmiana tej metody zwana też niekiedy klasycznym zapłodnieniem in vitro. Polega ona na umieszczeniu żeńskich

komórek rozrodczych (oocytów) i plemników w szalce laboratoryjnej, w specjalnym płynie zawierającym substancje odżywcze. W tej metodzie plemniki samodzielnie wnikają do komórek jajowych, w taki sam sposób jak w drogach rodnych kobiety w czasie naturalnego poczęcia. Jest to metoda najchętniej wybierana przez lekarzy, ponieważ jest ona najbardziej zbliżona do naturalnego zapłodnienia, aczkolwiek jej zastosowanie jest możliwe jedynie w około 30% przypadków.

Często przyczyną problemów z zajściem w ciążę jest właśnie to, że u danej pary naturalne wnikięcie plemnika do komórki jajowej jest niemożliwe. Może to wynikać z problemów zdrowotnych zarówno kobiety, jak i mężczyzny. W takich przypadkach lekarze decydują się zazwyczaj na zastosowanie metody zwanej ICSI (z ang. Intracytoplasmic sperm injection – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika). Polega ona na wprowadzeniu pod mikroskopem plemnika do wnętrza oocytu za pomocą cienkiej pipety, która poruszana jest przy pomocy bardzo precyzyjnych urządzeń zwanych mikromanipulatorami. Stosuje się ją w około 70% przypadków. Metoda ICSI ma zastosowanie głównie wtedy, kiedy niemożność zajścia w ciążę wynika z niepłodności u mężczyzny. Przyczyny niepłodności leżące po stronie mężczyzny związane są m.in. z nieprawidłową ruchliwością plemników czy zbyt małą liczbą plemników w nasieniu. Choć dotych-

czasowe doświadczenie wskazuje, że nie ma różnicy w częstości pojawiania się wad wrodzonych u dzieci urodzonych po stosowaniu procedury ICSI i standardowych metod IVF, to jednak należy pamiętać, że w przypadku zbyt małej liczby plemników w nasieniu przy ICSI istnieje prawdopodobieństwo wyselekcjonowania plemnika obciążonego wadą genetyczną. Bowiem przy tej metodzie wyboru plemnika, który ma być wstrzyknięty do oocytu, dokonuje się na podstawie jego ruchliwości oraz morfologii, a nie bierze się pod uwagę tego, jakie geny niesie dany plemnik.

Istnieją też metody polegające na ułatwieniu plemnikowi przedostania się przez barierę, którą musi pokonać w czasie wnikania do oocytu, czyli tak zwaną osłonkę przejrzystą, otaczającą i chroniącą oocyt. W czasie naturalnego zapłodnienia plemnik przebija się przez nią, a następnie wnika do wnętrza komórki jajowej. Aby ułatwić plemnikowi to przejście lekarze mogą zdecydować się na nacięcie osłonki przejrzystej, czyli metodę PZD (z ang.: partial zona dissection - częściowe przerwanie osłonki przejrzystej) bądź wprowadzenie kilku plemników pod osłonkę, czyli tak zwane SUZI (z ang.: sub-zonal insemination - zaplemnienie podosłonkowe). Niestety w czasie stosowania tych metod często do oocytu wnika więcej niż jeden plemnik, co uniemożliwia prawidłowy rozwój i dlatego stosuje się je bardzo rzadko.

Zalety

Zapłodnienie in vitro jest niewątpliwie wielką szansą na posiadanie

dziecka dla par, które mają problemy z naturalnym poczęciem, i u których nieskuteczne okazały się inne metody leczenia. W przypadku niektórych schorzeń, takich jak na przykład niedrożność jajowodów uniemożliwiająca dotarcie plemników do owulowanych oocytów, zapłodnienie pozaustrojowe jest jedyną nadzieją na posiadanie własnego potomstwa. Podobnie, jeżeli niepłodność dotyczy tak zwanego „czynnika męskiego”, czyli niskiej liczby lub jakości plemników, metoda ICSI połączona z wcześniejszą diagnostyką nasienia daje szansę na przezwycięzenie tego problemu.

Najnowsze udoskonalenia metody zapłodnienia in vitro dają też nadzieję na wyeliminowanie dziedziczenia chorób mitochondrialnych, będących groźną grupą chorób dziedziczonych od matki. Jeżeli pacjentka nie chce przekazać swojej choroby dzieciom, może zdecydować się na zapłodnienie in vitro połączone z tak zwanym transferem jądra. Ponieważ przyczyna chorób mitochondrialnych leży w wadliwie funkcjonujących mitochondriach obecnych w cytoplazmie oocytu, materiał genetyczny pacjentki może zostać przeniesiony do zdrowego oocytu pochodzącego od innej kobiety, z którego przedtem zostały usunięte chromosomy. Metoda ta nie jest jeszcze dostępna w Polsce, ale niedawno została zaakceptowana i wprowadzona do użytku w Wielkiej Brytanii.

Czego zapłodnienie in vitro nie rozwiązuje?

Mimo wielu zalet, zapłodnienie in vitro nie jest skuteczne w leczeniu niepłodności kobiet zależnej od wieku.

Dzieci poczęte dzięki metodzie in vitro mogą mieć takie same problemy rozwojowe, wynikające z późnego wieku reprodukcyjnego matki, jak dzieci poczęte naturalnie. Jedyną możliwością, jaką w tej chwili oferują metody wspomaganej reprodukcji, jest pozyskanie oocytów od kobiety w momencie, gdy nie ma jeszcze ryzyka, że poczęte dziecko będzie obciążone wadami wynikającymi z wieku matki i przeprowadzenie procedury zapłodnienia in vitro wtedy, gdy zdecyduje się na zajście w ciążę.

Porównanie dzieci, które przyszły na świat po zapłodnieniu in vitro i poczętymi w sposób naturalny

Po latach stosowania metody in vitro możliwe stało się przeprowadzenie badań, które mają na celu sprawdzenie wpływu tej metody na rozwój i zdrowie dzieci poczętych przy jej pomocy. Jak wiadomo, głoszone są sprzeczne opinie dotyczące zdrowia dzieci, które przyszły na świat poprzez sztuczne zapłodnienie. Często słyszymy jakże odmiennie informacje: „metoda ta jest niezawodna i w 100 % bezpieczna” lub „zapłodnienie in vitro niesie ze sobą ogromne ryzyko wystąpienia u dzieci wad genetycznych i wynikających z nich zaburzeń rozwojowych”. Jak jest naprawdę?

Warto pamiętać o tym, że dzieci poczęte dzięki zapłodnieniu in vitro, to dzieci rodziców, u których zdiagnozowano problemy z płodnością. Nie są to więc dzieci osób całkowicie zdrowych, co może powodować podwyższone szanse wystąpienia patologii ciąży i rozwoju. Niektóre badania sugerują, że dzieci poczęte metodą in vitro mogą być zagrożone zwiększonym ryzykiem przedwczesnego poro-

du, a także wystąpieniem niższej masy urodzeniowej, zaburzeń neurologicznych (trudności w uczeniu się, problemy językowe) i zwiększonej śmiertelności okołoporodowej. Nie jest to jednak najprawdopodobniej wynikiem samej procedury zapłodnienia pozaustrojowego, a problemów zdrowotnych rodziców. Należy też zwrócić uwagę na to, że ciążę mnogie stanowią ok. 25 % ciąż uzyskanych za pomocą zapłodnienia in vitro (dla porównania ciążę mnogie stanowią ok. 1% ciąż naturalnych). Ogólne problemy z ciążami mnogimi wynikłymi po zapłodnieniu in vitro są takie same jak w przypadku ciąż mnogich poczętych naturalnie. Czy to ciąża mnoga jest przyczyną powyższych zaburzeń? Wydaje się, że głównie tak, gdyż większość prac nie wykazuje zwiększonej częstości występowania wspomnianych problemów w przypadku ciąż pojedynczych uzyskanych przy pomocy in vitro.

Każdemu z nas zapewne nasuwa się pytanie, czy istnieją widoczne „gołym okiem” różnice między dziećmi urodzonymi po zapłodnieniu in vitro, a poczętymi naturalnie. U większości dzieci w wieku do lat 12 nie zauważono żadnych zmian w ogólnym rozwoju fizycznym. Pojawiają się doniesienia, że dzieci poczęte poprzez sztuczne zapłodnienie są wyższe, niż ich rówieśnicy poczęci naturalną metodą. Dyskutuje się czy zwiększony wzrost może prowadzić do późniejszego osłabienia zdrowia tych dzieci, ponieważ są dowody wskazujące na to, iż przyspieszony przyrost masy ciała w dzieciństwie może w przyszłości prowadzić nadciśnienia tętniczego. Poza tym w większości prac na ten temat nie

zaobserwowano różnic pomiędzy dziećmi poczętymi naturalnie a tymi po zapłodnieniu in vitro, jeśli chodzi o rozwój mowy, rozwój poznawczy oraz zachowanie (zarówno u dzieci kilkumiesięcznych jak i kilkuletnich). Istotne jest również, iż stwierdzono, że dzieci poczęte przy pomocy sztucznego zapłodnienia nie chorują częściej i nie wymagają częstszej hospitalizacji w porównaniu z dziećmi poczętymi naturalnie.

W obecnej sytuacji, kiedy coraz częściej słyszymy o rosnącym zagrożeniu nowotworami, istotnym problemem jest to czy „dzieci z in vitro” obarczone są ryzykiem zachorowania na choroby tego typu. Istnieją doniesienia, że dzieci poczęte poprzez sztuczne zapłodnienie mogą nieznacznie częściej zapadać na nowotwory takie jak siatkówczak, czy też ostra białaczka. Są to jednak bardzo nieliczne przypadki i nie ma przekonujących dowodów, by podejrzewać, że zapłodnienie in vitro może mieć jakikolwiek związek z rozwojem nowotworów u dzieci.

Jak wygląda sytuacja z rozwojem psychosocjalnym i życiem rodzinnym dzieci poczętych poprzez sztuczne zapłodnienie? Czy mają one problem z aklimatyzacją wśród rówieśników? Czy czują się zagubione i niechciane? Otóż, badania dotyczące dzieci czter-, ośmio- oraz dwunastoletnich nie wykazały wśród nich częstszego występowania problemów psychiatrycznych lub zmienionego zachowania w społeczeństwie. Dzieci te wykazują takie same zdolności komunikacyjne, poznawcze oraz taką samą pewność siebie jak dzieci poczęte naturalnie. Oczywiście zdarzają się sytuacje, gdy

dziecku trudno jest zaakceptować sposób, w jaki zostało poczęte, (jeśli o tym wie) lub z tego powodu brak mu poczucia własnej wartości, ale podobne sytuacje zdarzają się również w przypadku dzieci poczętych naturalnie, gdy nie mają one odpowiedniej opieki, bądź nie czują miłości rodzicielskiej. Jednocześnie panuje powszechna opinia, że dzieci poczęte przez in vitro są to dzieci upragnione i długo oczekiwane przez rodziców, a decyzja o ich poczęciu była w pełni świadoma.

Podsumowanie

Zapłodnienie in vitro to procedura skomplikowana pod względem biologicznym i medycznym, jest to także metoda dość kosztowna, wymagająca dużego zaangażowania i poświęcenia rodziców. Nie da się także wykluczyć tego, że jest również obciążona pewnym ryzykiem. W niektórych przypadkach, aby proces ten zakończył się sukcesem, wymaga przeprowadzenia wielu prób. Pomimo tego, procedura ta jest często jedyną szansą na posiadanie własnego dziecka dla par, które zmagają się z niepłodnością. Wykorzystanie techniki: IVF, ICSI, PZD i SUZI umożliwia w ich przypadku skuteczne zapłodnienie oocyty i po przeniesieniu zarodka do macicy zajście kobiety w ciążę.

Skuteczność metod IVF i ICSI jest podobna i wynosi przeciętnie około 30% ciąż na jeden cykl stymulacji hormonalnej, co owocuje około 20% szansą urodzenia dziecka na jeden cykl stymulacji. Skuteczność tej metody leczenia niepłodności jest oczywiście różna dla różnych par, biorąc pod uwagę ich specyficzne problemy

z płodnością. Na przykład w grupie kobiet młodych, u których jedynym problemem była niedrożność jajowodów, w 80% przypadków procedura kończyła się narodzinami zdrowego dziecka. Jednocześnie, także przy zastosowaniu metod wspomaganej reprodukcji, podobnie jak w przypadku naturalnego poczęcia, szanse na urodzenie dziecka maleją wraz z wiekiem przyszłej matki.

Większość dzieci poczętych in vitro jest w pełni zdrowa, główne ryzyko to przede wszystkim słabsze wyniki okołoporodowe – niższa masa urodzeniowa i przedwczesny poród. Nie można całkowicie wykluczyć tego, że

u dzieci poczętych metodą in vitro w niewielkim stopniu rośnie ryzyko wrodzonych anomalii chromosomalnych, wystąpienia bardzo rzadkich schorzeń i dużych wad płodu. Należy jednak podkreślić, że wzrost ryzyka jest nieznaczny. Nie wiadomo także czy przyczyną obserwowanych zaburzeń jest procedura in vitro, czy też inne czynniki m.in. stan zdrowia lub wiek rodziców. Bez wątpliwości jednak można stwierdzić, że rozwój psychosomatyczny tych dzieci jest w pełni prawidłowy, a prawdopodobnie jedynym realnym ryzykiem związanym z zapłodnieniem in vitro są ciążę mnogie.

Aitken, R. J. Age, the environment and our reproductive future: Bonking baby boomers and the future of sex. *Reproduction*. 147(2):S1-S11 (2014).

Dupont, C. i Sifer, C. A Review of Outcome Data concerning Children Born following Assisted Reproductive Technologies. *ISRN Obstet. Gynecol.* 405382 (2012).

Lu, Y.H., Wang, N. i Jin, F. Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)*. 14, 359-371 (2013).

Reefhuis, J., Honein M.A., Schieve L.A., Correa A., Hobbs C.A. i Rasmussen S.A. i National Birth Defects Prevention Study. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum. Reprod.* 24(2):360-6 (2009).

Servick K. Unsettled questions trail IVF's success. *Science*. 15;345(6198):744-6 (2014).

Wong, M. Y. W. i Ledger, W. L. Is ICSI Risky? *Obstet. Gynecol. Int.* 473289 (2013).

Rola mikroRNA w zaburzeniach afektywnych

Ewa Banach

Zakład Genetyki w Psychiatrii, Katedra Psychiatrii, Wydział Lekarski II

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ewabanach01@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr hab. n. med. Moniki Dmitrzak-Węglarz

Choroba afektywna należy do przewlekłych i wyniszczających chorób psychicznych dotykających nawet 20% społeczeństwa. Pomimo, że mechanizm etiopatologiczny choroby jest złożony, to nadal pozostaje on w dużej mierze nieznany. Postęp w zrozumieniu związków genów i sieci genowych dostarcza istotnych wskazówek na temat pierwotnych przyczyn choroby. Niniejsza praca o charakterze przeglądowym ma na celu uporządkowanie i upowszechnienie wiedzy z ostatnich lat dotyczącej związku miRNA z występowaniem zaburzeń afektywnych. Badania genetyczne w kierunku specyficznych transkryptów są obecnie atrakcyjnym celem badań w związku z poszukiwaniem biomarkerów, które w przyszłości pomogą ułatwić diagnostykę. Poznanie podłoża molekularnego może również zrewolucjonizować metody leczenia.

Wprowadzenie

MikroRNA (miRNA) są przykładem funkcjonalnych niekodujących białek RNA. Biorą udział w regulacji potranskrypcyjnej poprzez wpływanie na translację i stabilność mRNA [1]. Są to krótkie ~22 nukleotydowe (19-24nt) jednoniciowe fragmenty RNA [2]. Po raz pierwszy odkryto je w trakcie badań nad rozwojem *Caenorhabditis elegans* w latach 90. Wykryto miRNA lin-4 komplementarne do mRNA genu lin-14. Okazało się, że lin-4 zmniejsza ekspresję lin-14. Geny dla miRNA u człowieka mieszczą się głównie (25-40%) w intronach i/lub egzonach genów strukturalnych, a także w obszarach międzygenowych [3]. Funkcja miRNA wiąże się z regulacją wielu genów. Dotychczasowe badania wskazują na istotny udział tych cząsteczek w takich procesach jak np.: karcynogeneza, re-

gulacja metabolizmu, angiogeneza, a także reakcja immunologiczna w przebiegu infekcji wirusowych [4].

Biogeneza mikroRNA została dobrze poznana i opisana. W skrócie proces powstawania miRNA rozpoczyna się przy udziale polimerazy II (najczęściej), z której udziałem zachodzi transkrypcja genów kodujących miRNA. Transkrypt pierwotny miRNA (pri-miRNA) na końcu 5' posiada czapkę z 7-metyloguanozyny oraz ogon, którego koniec 3' jest złożony z Poli-A. W obrębie tej struktury można wyróżnić fragment długości około 60-70 nt, przypominający strukturę spinki do włosów (harpin). Następnie enzym DROSHA tnie pri-miRNA u podstawy harpin. Powstała w ten sposób struktura pre-miRNA, przy udziale białka transportowego eksportyny-5, przenika

do cytoplazmy. Tam enzym DICER wykorzystując energię z ATP tnąc skrajne końce pre-miRNA przekształca go w przejściowy dupleks długości ~21nt. Dupleksy te są nietrwałe, po rozpadzie jedna z nici – dojrzały miRNA łączy się z enzymem RISC – który kieruje go do docelowego mRNA [3].

miRNA w zaburzeniach psychicznych

Badania przeprowadzone u kręgowców pokazały jak ważną rolę odgrywają miRNA w rozwoju tych organizmów, w tym ośrodkowego układu nerwowego. Zaobserwowano między innymi, że:

- miRNA i inne niekodujące RNA są obecne w mózgu;
- miRNA wpływa zarówno na neurogenezę jak i na szlaki neuroprzekaźników
- na modelach zwierzęcych potwierdzono, że miRNA jest istotnym regulatorem w rozwoju układu nerwowego
- badania prowadzone na hodowlach komórkowych wykazały, że miRNA bierze udział w różnicowaniu się neuronów

Poczynione obserwacje pozwoliły na sformułowanie hipotezy o udziale miRNA w molekularnym podłożu zaburzeń układu nerwowego [5]. Dowody potwierdzające ww. hipotezę wynikają z badań nad cyklem okołodobowym zwierząt i ich związkiem z miRNA [6]. Ze względu na istotne znaczenie miRNA, zarówno dla rozwoju mózgu, jak i dla zachowania, molekula ta wydaje się istotnym czynnikiem w etiologii zaburzeń psychicznych. Z tego też względu stała się obiecującym obiektem badań opartych na analizie mikromacierzy oraz ilościowej odwróconej reakcji polimerazy (qRT-PCR), uzupeł-

nionych o badania genetyczne skierowane na identyfikację polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz zmiany liczby kopii (CNV).

W zaburzeniach psychicznych punktem wyjścia w badaniach nad ekspresją miRNA są badania post mortem tkanki mózgowej - głównie okolic kory przedczołowej i hipokampa. Z jednej strony badania te pozwalają na bezpośredni wgląd w zmiany zachodzące w mózgu – tkance najistotniejszej w zaburzeniach psychicznych. Z drugiej strony jest to jednak metoda obarczona pewnymi ograniczeniami związanymi z pośmiertnymi zmianami zachodzącymi w mózgu, które wpływają na integralność RNA, a tym samym mogą zaburzać wyniki analiz ekspresji i poprawność ich interpretacji [7].

W dalszej kolejności miRNA o zidentyfikowanej odmiennej ekspresji post mortem u pacjentów z zaburzeniami psychicznymi stanowią cel poszukiwań we krwi obwodowej. Ten łatwy do pozyskania materiał badawczy pozwala na poszukiwanie pośród wytypowanych kandydujących miRNA potencjalnych biomarkerów o charakterze diagnostycznym (obiektywne badanie laboratoryjne wspierające lub potwierdzające diagnozę lekarską) i predykcyjnym (ocena rokowania, przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie).

Dalsza część artykułu poświęcona jest przedstawieniu istotnych wyników dotychczasowych badań dotyczących zmian poziomu ekspresji miRNA w chorobach afektywnych takich jak depresja (depression) i choroba afektywna dwubiegunowa (bipolar disorder, BP).

Depresja

Depresja jest to stan psychiczny charakteryzujący się obniżeniem nastroju, któremu często towarzyszą dodatkowe objawy, takie jak np.: lęk, poczucie niskiej wartości, myśli samobójcze, spowolnienie psychomotoryczne oraz różne objawy somatyczne np.: bezsenność, zaburzenia apetytu [8].

Pierwsze dowody na istnienie związku pomiędzy depresją a miRNA pochodzą z dwóch niezależnych badań nad inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) – fluoksetyny [9,10]. Leczenie fluoksetyną, przed ustąpieniem objawów, trwa zwykle kilka tygodni, co sugeruje, że leki przeciwdepresyjne wywołują ważne zmiany w szlaku neurotransmisji serotoninerгіcznej. W wyniku analizy komputerowej zidentyfikowano miR-16 jako regulator genu transportera serotoniny – SERT. W badaniach z wykorzystaniem ludzkich neuroektodermalnych linii komórkowych i badaniach in vivo na zwierzętach zablokowano ekspresję miR-16 drogą sygnałową Wnt. Wykorzystanie fluoksetyny spowodowało ponowne zwiększenie poziomu miR-16. Zwiększenie stężenia miR-16 doprowadziło do zmniejszenia ilości transportera serotoniny co może być związane ze wzmocnieniem sygnalizacji serotoniny w synapsie [10]. Kolejne badanie tej samej grupy badawczej sprawdzało rolę miR-16 w neurogenezie w mysim hipokampie. Zauważono różnicę w działaniu leku w różnych obszarach mózgu. Fluoksetyna wpłynęła pozytywnie na dojrzewanie miR-16 w jądrze

szwu, obniżyła poziom miR-16 w miejscu sinawym i hipokampie [9]. Pomimo obiecujących wyników badań kandydujących miRNA podjęto tylko kilka prób badających rolę miRNA u pacjentów z depresją.

Samobójstwo to celowe działanie mające na celu odebranie sobie życia. Zaburzenia psychiczne stwierdzane są od 27-90% przypadków samobójców, przy czym połowa osób, które giną w rezultacie samobójstwa, cierpi na zaburzenia depresyjne [11]. Badania nad ekspresją miRNA w tkance mózgowej post mortem pacjentów z dokonanym samobójstwem w przebiegu depresji przedstawiają ogólne obniżenie poziomu mikroRNA [12], z wyjątkiem zwiększonego poziomu miRNA w przypadku: miR-139, miR-320 i miR-34, które związane są z regulacją ekspresji dwóch genów: SAT1 (związany z metabolizmem poliamin) i SMOX (odgrywa rolę w regulacji cyklu komórkowego i neurotransmisji), których obniżenie poziomu obserwowano post mortem u samobójców z diagnozą depresji [13]. Li i wsp. (2013) skupili się nad oceną poziomów miRNA jako potencjalnych biomarkerów depresji. Do badania wytypowano dwa kandydujące miRNA: miR-132 i miR-182, odpowiedzialne za zmniejszenie poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF). Zauważono ich zwiększony poziom w depresji w surowicy [1].

Badano również ekspresję na poziomie miRNA z wykorzystaniem mikromacierzy. Oznaczenia zostały przeprowadzone na fibroblastach uzyskanych od pacjentów z depresją oraz z grupy kontrolnej. Zidentyfikowano zmiany na poziomie

ekspresji 38 miRNA, biorących udział w regulacji ekspresji genów związanych z komunikacją międzykomórkową, wrodzoną i nabytą odpornością oraz proliferacją komórek [14].

Większość dotychczasowych badań skupiła się na zmianach w ekspresji miRNA związanymi z wpływem leków przeciwdepresyjnych. Badania zaprezentowane przez Angelucci i wsp. (2011) były przeprowadzone na liniach komórkowych glejaka. Miały one na celu określić poziom ekspresji miR-30 podczas terapii paroksetyną. Zaobserwowano zmniejszenie poziomu miR-30 z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji BDNF [15]. Z kolei Belzeaux i wsp. (2012) przeprowadzili profilowanie miRNA krwi obwodowej pacjentów z depresją. Stwierdzono podwyższony poziom dwóch miRNA: miR-589 oraz miR-941, bez względu na rodzaj stosowanej farmakoterapii [16]. W innych badaniach wykorzystano linie komórek limfoblastoidalnych. Badania skupiły się nad zmianami ekspresji miRNA po terapii paroksetyną. Stwierdzono zmniejszenie odpowiedzi na leczenie tym lekiem. Zauważono również, iż w liniach, których dawcą były kobiety nastąpił wzrost ekspresji miRNA miR-151 [17].

Zaobserwowano również zmianę poziomu ekspresji 30 miRNA po podaniu leków przeciwdepresyjnych (escitalopram) we krwi obwodowej pacjentów z depresją. Badania te jednak przeprowadzone były na małej grupie, w związku z czym mogą być jedynie podstawą do postawienia hipotezy o ich związku z efektem leczenia [18].

Zaburzenie afektywne dwubiegunowe

Zaburzenie afektywne dwubiegunowe (bipolar disorder, BP) charakteryzuje się występowaniem dwóch lub więcej epizodów istotnego zaburzenia nastroju i aktywności pacjenta. Obserwuje się występujące odrębnie okresy wzmożenia nastroju jak i jego obniżenia (objawy depresji). Wzmożenie nastroju może objawiać się występowaniem hipomanii – utrwalone, łagodne podwyższenie nastroju, energii i aktywności lub manii – wzmożenie nastroju, któremu mogą towarzyszyć również urojenia i omamy [8].

Podobnie jak w depresji, BP jest chorobą wieloczynnikową o nieustalonej jednoznacznie etiologii. Podobieństwa i różnice w obrazie klinicznym implikują hipotezę o częściowo wspólnym podłożu biologicznym obu chorób. Zaburzenia afektywne najczęściej rozpoczynają się od epizodu depresyjnego, na podstawie którego nie można postawić jednoznacznej diagnozy o depresji lub BP. Zatem poszukiwanie biomarkerów różnicujących pacjentów cierpiących na depresję i BP przy pierwszym epizodzie choroby jest ważnym celem diagnostycznym, pozwalającym na włączenie właściwego leczenia prewencyjnego.

Leki normotymiczne stanowią istotny element leczenia i profilaktyki w obu biegunach tj. manii i depresji w BP. Najczęściej stosowanym lekiem z wyboru są sole litu [19].

Pierwsze badania dotyczące związku miRNA z leczeniem litem u pacjentów BP przeprowadzono w limfoblastoidalnych liniach komórkowych. Linie zostały wyprowadzone od dawców,

którymi byli pacjenci z BP oraz nieleczone rodzeństwo, u którego nie stwierdzono objawów w momencie badania (wewnętrzna grupa kontrolna) [20]. Na podstawie wcześniejszych badań wytypowano do analiz 13 miRNA, po których spodziewano się zmian ekspresji po leczeniu litem [21]. Po 16 dniach leczenia u pacjentów nastąpiła zmiana poziomu ekspresji tylko 4 z 13 badanych miRNA (miR-34a, miR-152, miR-155, miR-221). Z kolei badania przeprowadzone w Instytucie Zdrowia Psychicznego w Shenzhen wykazały obniżenie poziomu ekspresji miR-134 podczas epizodu manii. U tych pacjentów u których leczenie litem okazało się skuteczne zaobserwowano zwiększenie poziomu ekspresji tego miRNA [22].

W badaniach Weigelt i wsp. (2013) brały udział pacjentki z psychozą poporodową. W monocytach wyizolowanych z krwi stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji miR-146 oraz miR-212 u tych pacjentek, u których wcześniej zdiagnozowano BP, w przeciwieństwie do kobiet u których nie stwierdzono wcześniej BP oraz do grupy zdrowej kontroli [23].

Walker i wsp. na podstawie wcześniejszych badań dotyczących miRNA w BP i schizofrenii wytypowali do analizy 20 miRNA. Przeprowadził ich analizę w grupie młodych, nieleczonych krewnych I stopnia, w porównaniu do zdrowej kontroli. Stwierdził zwiększoną ekspresję trzech miRNA: miR-15, miR-132 i miR-652. Wyniki te sugerują, że zmieniona ekspresja tych miRNA może stanowić istotny element podatności genetycznej na BP [24].

W innym badaniu uwaga naukowców

skupiła się na miR-137. Materiałem do oznaczeń była okolica kory przedczołowej zmarłych pacjentów cierpiących na BP i schizofrenię oraz tkance pobranej post mortem od zdrowej kontroli. Stwierdzono zwiększoną ekspresję miR-137 zarówno u chorych na schizofrenię i BP w porównaniu do grupy kontrolnej [25]. Wyniki tych badań potwierdzają, że zaburzenia psychiczne przynajmniej częściowo mają wspólne podłoże biologiczne.

Bavarian i wsp. (2015) ocenili poziom ekspresji miR-34 w kilku obszarach mózgu post mortem. Stwierdzono zwiększoną ekspresję miR-34 w mózdku u pacjentów w porównaniu do kontroli. Zauważono również wyraźne różnice dotyczące płci. Wykazano wyższą ekspresję miR-34 w mózgu kobiet w porównaniu do mężczyzn z BP. Nie stwierdzono podobnych różnic między kobietami i mężczyznami w grupie kontrolnej. Dodatkowo w tych samych badaniach wykorzystano fibroblasty w celu uzyskania z nich indukowanych linii komórek pluripotentnych (iPS). Po pobraniu fibroblastów od jednego pacjenta i jednej osoby zdrowej i otrzymaniu z nich prekursorowych komórek nerwowych (hNPC), wykazano w obu przypadkach zmniejszony poziom ekspresji miR-34e. Natomiast po zróżnicowaniu komórek prekursorowych w nerwowe, zaobserwowano wyraźny wzrost tego miRNA w linii pochodzącej od pacjenta [26].

Wang i wsp. (2014) analizowali związek polimorfizmu w obrębie sekwencji kodującej miRNA-206 z ryzykiem BP oraz odpowiedzią na leczenie normotymiczne. miRNA-206 został wytypowany do

analiz w związku z jego udziałem w regulacji translacji mRNA dla genu BDNF. Analizie poddano dwa polimorfizmy - jeden w genie MIR206 (rs16882131) oraz funkcjonalny polimorfizm Val66Met w genie BDNF (rs6265). Nie stwierdzono istotnych związków w analizie pojedynczych polimorfizmów, natomiast stwierdzono silną interakcję gen x gen oraz istotny wpływ na związek z ryzykiem choroby i efektem leczenia. Wyniki te wydają się być istotnym uzupełnieniem analiz interakcji [27]. Pełne nazwy charakterystycznych miRNA dla prezentowanych chorób zawarte są w Tabeli 1.

Dyskusja

Zaprezentowane badania skupiły się na poszukiwaniu miRNA charakterystycznych dla zaburzeń afektywnych w tkance mózgowej post mortem, liniach komórkowych i krwi obwodowej. Badania te stanowią wstępny etap analiz prowadzących do wytypowania biomarkerów molekularnych chorób psychicznych. Jest to ogromne wyzwanie, którego głównym celem jest stworzenie laboratoryjnych paneli diagnostycznych, ułatwiających postawienie diagnozy przez lekarza psychiatrę oraz dobranie optymalnego leczenia zgodnie z ideą medycyny spersonalizowanej. Drugim ważnym celem jest opracowanie nowych celów i środków terapeutycznych. Trudnością prowadzonych badań jest fakt, że te same miRNA, które różnicują chorych i zdrowych często są wspólne dla niektórych jednostek chorobowych [24,25]. Jest to wynikiem regulacji ekspresji wielu genów przez jedno miRNA.

Na obecnym etapie badań wykazano w wielu przypadkach związek poszczególnych miRNA z chorobą. Jednak do poznania ich roli na poziomie molekularnym konieczne są wieloetapowe badania obejmujące: bioinformatyczne analizy miejsca startu transkrypcji ze względu na brak pełnej walidacji eksperymentalnej; poznanie polimorfizmów SNP dla wewnątrzgenowych (intragenic) miRNA znajdujących się w obrębie sekwencji genów kodujących białka (host gene), które mogą wpływać zarówno na ekspresję miRNA jak i białka genu „gospodarza”; ocena ilościowa ekspresji miRNA; przewidywanie genów docelowych, których ekspresja jest regulowana przez odpowiedni miRNA oraz zintegrowana analiza uzyskanych danych genetycznych i szlaków biologicznych [28]

Wielkie nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania miRNA jako środków terapeutycznych. Istotnym problemem wydaje się przekroczenie bariery krew-mózg przez syntetyczne anty-miRNA. Na obecnym etapie pokonanie tej bariery wydaje się możliwe jedynie poprzez bezpośrednie podanie miRNA do mózgu, co jest związane z zabiegami wysokiego ryzyka utraty zdrowia, a nawet życia [29].

Wśród prezentowanych badań materiałem wyjściowym była często tkanka mózgowa post mortem. Nie jest to jednak idealne źródło wyników, ze względu na daleko posuniętą degradację, zarówno komórek, jak i transkryptów RNA [30]. Z oczywistych względów, wyżej przedstawionych, nie możliwe są badania przyżyciowe na tkance mózgowej. Alternatywą jest badanie płynu

miRNA	Poziom regulacji	materiał	piśmiennictwo
Depresja			
hsa-miR-139-5p hsa-miR-320c hsa-miR-34c-5p	+	tkanka mózgowa <i>post mortem</i>	Lopez et al. 2014
hsa-miR-132-3p hsa-miR-182-5p	+	surowica	Li et al. 2013
hsa-miR-30a-5p hsa-miR-589-5p hsa-miR-941	+	linie komórkowe glejaka	Angelucci et al. 2011
hsa-miR-151a-3p	+	krew obwodowa	Belzeaux et al. 2012
	+	linia komórek limfoblastoidalnych	Oved et al. 2012
Zaburzenie afektywne dwubiegunowe			
hsa-miR-34a-5p hsa-miR-152-3p hsa-miR-155-5p hsa-miR-221-3p	+	linia komórek limfoblastoidalnych pobrana od pacjentów	Chen et al. 2009
hsa-miR-134-5p	-	krew obwodowa (epizod manii)	Schratt et al. 2006
hsa-miR-212-3p hsamiR-92a-3p	-	monocyty/krew obwodowa (psychoza poporodowa)	Weigelt et al. 2013
hsa-miR-15b hsa-miR-132 hsa-miR-652	+	krew obwodowa	Walker et al. 2015
miR-137	+	tkanka mózgowa <i>post mortem</i>	Guella et al. 2013
miR-34a	+	tkanka mózgowa <i>post mortem</i> , iPS	Bavamian et al. 2015

(+) zwiększona ekspresja, (-) zmniejszona ekspresja w porównaniu do grupy kontrolnej;

Tabela 1. Wykaz miRNA o istotnym związku z chorobami afektywnymi

mózgowo-rdzeniowego. Ze względu na najmniejszą inwazyjność zdecydowanie najlepszym materiałem do poszukiwań biomarkerów jest krew obwodowa. Badania nowotworów mózgu wykazały, że przynajmniej część miRNA jest uwalniana przez komórki nowotworowe do krwiobiegu [31]. Na ich podstawie możemy sadzić, że podobna sytuacja ma miejsce w przypadku miRNA ulegających ekspresji w mózgu. Wydają się zatem zasadne profile ekspresji miRNA we krwi obwodowej i poszukiwanie różnic dla poszczególnych chorób psychicznych.

Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki należy traktować jako wstępne, mające na celu ocenę możliwości wykorzystania mikroRNA jako biomarkerów choroby oraz środków terapeutycznych [32]. Wyniki te są bardzo obiecujące i otwierają nowe możliwości analizy molekuł miRNA, które mogą przyczynić się do postępu w dziedzinie biomarkerów i możliwości terapeutycznych w psychiatrii.

Bibliografia:

- [1]Li YJ et al. Alterations of serum levels of bdnf-related mirnas in patients with depression. *PloS one*. 2013;8:e63648.
- [2]Zhang B,Farwell MA. Micrnas: A new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12:3-21.
- [3]Filip A. [mirna--new mechanisms of gene expression control]. *Postepy biochemii*. 2007;53:413-419.
- [4]Kruczek K. Mikrorna - znaczenie w terapii genowej. *Acta Mygenica*. 2010;2:48-62.
- [5]Rogaev EI. Small rnas in human brain development and disorders. *Biochemistry Biokhimiia*. 2005;70:1404-1407.
- [6]Cheng HY et al. Microrna modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*. 2007;54:813-829.
- [7]Mamdani F et al. Coding and noncoding gene expression biomarkers in mood disorders and schizophrenia. *Disease markers*. 213;35:11-21.
- [8]WHO. Leksykon terminów: Psychiatria i zdrowie psychiczne. 1 wyd Warszawa: Instytut Psychiatrii i Neurologii. 2001
- [9]Launay JM et al. Raphe-mediated signals control the hippocampal response to sri antidepressants via mir-16. *Translational psychiatry*. 2011;1:e56.
- [10]Baudry A et al. Mir-16 targets the serotonin transporter: A new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*. 2010;329:1537-1541.
- [11]Chang B et al. The depressed patient and suicidal patient in the emergency department: Evidence-based management and treatment strategies. *Emergency medicine practice*. 2011;13:1-23; quiz 23-24.
- [12]Smalheiser NR et al. Microrna expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PloS one*. 2012;7:e33201.
- [13]Lopez JP et al. Regulatory role of mirnas in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2014;17:23-32.
- [14]Garbett KA et al. Coordinated messenger rna/microrna changes in fibroblasts of patients with major depression. *Biological psychiatry*. 2015;77:256-265.
- [15]Angelucci F et al. Paroxetine rapidly modulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mrna and protein in a human glioblastoma-astrocytoma cell line. *Pharmacology*. 2011;87:5-10.
- [16]Belzeaux R et al. Responder and nonresponder patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. *Translational psychiatry*. 2012;2:e185.
- [17]Oved K et al. Genome-wide mirna expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies tentative ssri antidepressant response biomarkers. *Pharmacogenomics*. 2012;13:1129-1139.
- [18]Bocchio-Chiavetto L et al. Blood microrna changes in depressed patients during antidepressant treatment. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2013;23:602-611.
- [19]Rybakowski J. Mood-stabilizing drugs in various types of bipolar affective illness. *Psychiatria*. 2007;4:1-7.
- [20]Chen H et al. Microrna expression changes in lymphoblastoid cell lines in response to lithium treatment. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2009;12:975-981.
- [21]Schratt GM et al. A brain-specific microrna regulates dendritic spine development. *Nature*. 2006;439:283-289.
- [22]Rong H et al. Microrna-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *Journal of psychiatric research*. 2011;45:92-95.
- [23]Weigelt K et al. Down-regulation of inflammation-protective micrnas 146a and 212 in monocytes of patients with postpartum psychosis. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;29:147-155.
- [24]Walker RM et al. Preliminary investigation of mirna expression in individuals at high familial risk of bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*. 2015;62:48-55.
- [25]Gueula I et al. Analysis of mir-137 expression and rs1625579 in dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of psychiatric research*. 2013;47:1215-1221.
- [26]Bavamian S et al. Dysregulation of mir-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. *Molecular psychiatry*. 2015
- [27]Wang Z et al. Mirna-206 and bdnf genes interacted in bipolar i disorder. *Journal of affective disorders*. 2014;162:116-119.
- [28]Williamson VS et al. Expression quantitative trait loci (eqtls) in microrna genes are enriched for schizophrenia and bipolar disorder association signals. *Psychological medicine*. 2015:1-13.
- [29]Junn E,Mouradian MM. Micrnas in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential.

Pharmacology & therapeutics. 2012;133:142-150.

[30]Catts VS et al. A microarray study of post-mortem mrna degradation in mouse brain tissue. Brain research Molecular brain research. 2005;138:164-177.

[31]Kroh EM et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative

reverse transcription-pcr (qrt-pcr). Methods.

2010;50:298-301.

[32]Hommers LG et al. Heterogeneity and individuality: MicroRNAs in mental disorders. Journal of neural transmission. 2015;122:79-97.

Zaburzenia liczby i funkcji komórek NK u ludzi

Agnieszka Bodzioch, Izabela Górską

Studenckie Koło Naukowe Immunologii Zakażeń Wirusowych przy Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum w Krakowie

Praca napisana pod opieką: dr n. med. Marzeny Lenart

Komórki NK (ang. natural killer) to duże ziarniste limfocyty należące do wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. We krwi obwodowej człowieka stanowią od 5 do 20% limfocytów [78]. (Rys.1) Komórki NK mają na swojej powierzchni charakterystyczne markery i receptory takie jak CD16, najważniejszy receptor biorący udział w cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ang. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) czy cząsteczka adhezyjna CD56 (Rys.1). Główną rolą komórek NK jest zabijanie komórek zakażonych przez wirusy, nowotworowych oraz prawidłowych komórek hematopoetycznych wykazujących ekspresję allogenicznych cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej. Liza komórki docelowej następuje poprzez działanie perforyn i granzymów wydzielanych przez lizosomy komórek NK lub dzięki aktywacji „receptorów śmierci” na komórkach docelowych, takich jak np. Fas [78]. Komórki NK zdolne są również do sekrecji różnych cytokin i chemokin takich jak interferon γ (IFN- γ), istotny w odpowiedzi przeciwwirusowej, czynnik martwicy nowotworów (ang. tumour necrosis factor, TNF), czynnik stymulujący tworzenie koloni granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), interleukinę 5 (IL-5), IL-13, białko zapalne makrofagów (z ang. macrophage inflammatory protein, MIP-1) i RANTES [77]. Uwalnianie tych cytokin stymuluje zależną od limfocytów Th1 aktywację makrofagów zabijających wewnątrzkomórkowe patogeny i wzrost ekspresji cząsteczek antygenów zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex, MHC) klasy I. Dodatkowo komórki NK mogą zapewniać sygnały ko-stymulujące pomiędzy limfocytom T i B poprzez CD40L i OX40L [80].

Rola komórek NK w odpowiedzi przeciwwirusowej.

Układ immunologiczny, poprzez wykształcenie wielu swoistych elementów komórkowych, jak i humoralnych, odgrywa ogromną rolę w zwalczaniu zakażeń wirusowych. Wśród komórek biorących udział w odpowiedzi przeciwwirusowej wyróżniamy m.in.: komórki dendrytyczne (DC), ko-

mórki NK, monocyty- makrofagi, neutrofile, trombocyty, limfocyty T i ich subpopulacje oraz limfocyty B [69, 70, 71, 72, 73]. Podczas infekcji dochodzi do wzrostu naturalnej cytotoksyczności komórek NK wobec komórek zakażonych wirusami [74]. Napływ komórek NK do miejsca zakażenia odbywa się pod wpływem miejscowo wytwarzanych chemokin, np. CCR7 (ang. C-C

chemokine receptor type 7), czy CXCR4 (z ang. C-X-C chemokine receptor type 4), po czym następuje niszczenie komórek zainfekowanych wirusem. Aktywacja komórek NK, a tym samym zabijanie przez nie komórek docelowych, możliwa jest dzięki obecności różnorodnych receptorów na powierzchni komórek NK, które może podzielić na hamujące, jak receptor KIR (ang. killer cell inhibitory receptors) i CD94/NKG2A, oraz aktywujące, jak CD16, receptory lektyno-podobne typu C, receptory naturalnej cytotoxyczności (ang. natural cytotoxicity receptors, NCR) oraz receptory z rodziny SLAM (ang. signaling lymphocyte activating molecules) [79]. Dla naturalnych ligandów receptorów hamujących KIR oraz CD94/NKG2A, są antygeny MHC klasy I na powierzchni potencjalnych komórek docelowych [3-5]. W wyniku interakcji pomiędzy obiema cząsteczkami dochodzi do fosforylacji reszt tyrozynowych motywów hamujących ITIM (ang. immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif), stanowiących fragment wewnątrzkomórkowej domeny białkowej receptora [6]. Następstwem tego jest zahamowanie funkcji cytotoxycznej komórki NK. Brak lub obniżenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I obserwuje się na komórkach nowotworowych lub zakażonych wirusem, co prowadzi do efektu przeciwnego, czyli braku hamowania aktywności komórek NK [3]. Dzięki temu mechanizmowi komórki NK są zdolne do zabijania zakażonych wirusem komórek, które poprzez zmniejszenie ekspresji MHC klasy I na swojej powierzchni wymykają się spod kontroli limfocytów T. Natomiast w wyniku związania receptorów aktywujących z ligandami obecnymi na komórkach zakażonych bądź zmienionych nowotworowo prowadzi do aktywacji cyto-

toksyczności komórek NK [81]. Z drugiej strony, aktywacja komórek NK może być także spowodowana zwiększoną ekspresją ligandów (obecnych na komórkach zmienionych czy zakażonych) dla receptorów aktywujących obecnych na komórkach NK. Dla przykładu, receptor NKG2D wiąże cząsteczki ligandów, jakimi są białka MICA, MICB czy UL16, których to ekspresja jest bardzo niska lub niewykrywalna na komórkach zdrowych, lecz znacznie wzrasta na komórkach zakażonych czy będących pod wpływem stresu oksydacyjnego [82]. Natomiast, receptory naturalnej cytotoxyczności rozpoznają ligandy pochodzenia wirusowego, obecne na zakażonych komórkach, np. receptor NKp30 rozpoznaje cząsteczkę osłonki wirusa cytomegalii – pp65 [83], a receptory NKp44 i NKp46 wiążą cząsteczki hemaglutyniny i neuraminidazy wirusa grypy [84].

Po rozpoznaniu komórki docelowej przez komórkę NK następuje tworzenie się pomiędzy nimi immunologicznej synapsy, następnie dochodzi do polaryzacji centrum organizacji mikrotubul (z ang. microtubule-organizing center, MTOC) i sekrecji ziarnistości w kierunku błony presynaptycznej, po zetknięciu się z nią dochodzi do uwolnienia perforyn i granzymów do szczeliny synaptycznej. Perforyny, będące glikoproteinami, w ziarnistościach związane są z kalretikulina, która wiążąc jony Ca^{2+} , zapobiega spontanicznej zmianie konformacji i tworzeniu kanałów preforynowych w błonach ziaren cytolitycznych. Jednak po degranulacji perforyny w wyniku powinowactwa do fosfatydylocholiny posiadającej zdolność wiązania jonów Ca^{2+} , wbudowują się do błony komórki docelowej tworząc kanały. Średnica porów jest na tyle duża, że umożliwia wypływ i dopływ do cy-

toplazmy różnych jonów i polipeptydów, powodując zniesienie integralności komórki, zaburzenie gospodarki mineralnej i szok toniczny. W wyniku działania perforyn dochodzi do indukcji apoptozy w komórce docelowej, co w konsekwencji prowadzi, poprzez wniknięcie jonów wapnia, do aktywacji endonukleaz oraz granzymów i degradacji DNA [89].

Ludzki organizm jest także zdolny do wytwarzania komórek NK pamięci, które efektywniej i szybciej biorą udział w zwalczaniu komórek zakażonych wirusem, co odbywa się w niżej przedstawionych etapach:

1. Kontakt z wirusem - wielokrotna proliferacja komórek NK w śledzionie i wątrobie;
2. Przebywanie przez kilka miesięcy w narządach limfatycznych i nielimfatycznych po redukcji ich liczby po zwalczeniu zakażenia;
3. Reaktywacja, degranulacja i wydzielanie cytokin przez komórek NK pamięci po ponownym kontakcie z wirusem [75].

Rozwój komórek NK oraz ich subpopulacje

Komórki NK stanowią populację komórek pochodzących ze szpiku, posiadającą wspólną komórkę progenitorową z limfocytami T [2]. W odróżnieniu od limfocytów B i T, ich różnicowanie oraz funkcje nie są uzależnione od rearanżacji genów immunoglobulinowych [11-12]. Fenotypowo, komórki te charakteryzuje obecność powierzchniowych cząsteczek CD56 i brak cząsteczki CD3 [13]. Podstawowym rezerwuarem komórek NK nie jest, jak niegdyś uważano, krew, ale strefa T zależna węzłów chłonnych oraz migdałki, w których przeważają komórki o wysokiej ekspresji cząsteczki CD56 (CD56bright) [17]. Przyjęta obecnie hipoteza zakłada, iż stanowią one

niedojrzałe prekursorzy komórek o niskiej ekspresji cząsteczki CD56 (CD56dim), które to z kolei są końcowym stadium rozwojowym komórek NK [18-19]. Potwierdzają to badania, w których kontakt komórek NK CD56bright z węzła chłonnego z limfocytami T, produkującym IL-2, powodował ich transformację do CD56dimCD16+ i wzrost ich cytotoksyczności [20]

Komórki NK standardowo dzieli się na dwie subpopulacje: CD56dim (CD16brightCD56dim), tj. dojrzałe, stanowiące ok. 90% komórek NK krwi obwodowej; oraz CD56bright (CD56brightCD16dim), czyli komórki mniej dojrzałe, stanowiące ok. 10% (Rys. 2 A). Można je również podzielić pod względem poziomu ekspresji markerów CD16 i CD56 na pięć subpopulacji: (1) CD56brightCD16- (50-70% of CD56bright), (2) CD56brightCD16dim(30-50% of CD56bright), (3) CD56dimCD16-, (4) CD56dimCD16bright, (5) CD56-CD16bright [7-9] (Rys.2 B)

Różnice w fenotypie i funkcji obu subpopulacji, CD56dim i CD56bright, wynikają z różnorodnej ekspresji ich białek powierzchniowych, co przedstawia tabela 1 [Tab.1]. Komórki o fenotypie CD56dim, ze względu na wysoką ekspresję cząsteczek CD16, odpowiadających za reakcję ADCC oraz większą zawartość perforyn, granzymów i cytolitycznych ziarnistości, charakteryzują się wysoką cytotoksycznością, w odróżnieniu od komórek o fenotypie CD56bright, posiadających znacznie mniejszą ilość cząsteczek CD16 na swojej powierzchni [15]. Natomiast, komórki CD56bright są bardziej efektywnymi producentami cytokin takich jak INF- γ (którego głównym źródłem są komórki NK), TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-13 [7] [16], peł-

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
CD56	++	+
CD16	+/-	++
RECEPTORY HAMUJĄCE		
KIR	-	+
ILT2	-	+
CD94/NKG2A	++	+/-
RECEPTORY AKTYWUJĄCE		
CD117	++	-
RECEPTORY DLA CYTOKIN		
IL2Rαβγ	+	-
IL2Rβγ	++	+
IL-1RI, IL-18R	++	+
RECEPTORY CHEMOKINOWE		
CCR7	++	-
CXCR3	++	+/-
CXCR1	-	++
CXCR1	-	++
CZĄSTECZKI ADHEZYJNE		
CD2, CD11c, CD54, CD62L	++	+/-
CD11a	+	++
INNE CZĄSTECZKI		
CD57	-	+
CD160	-	++
HLA-DR	+	-

Tab.1 Różnice fenotypowe komórek CD56^{bright} i CD56^{dim} [20]. ++ silna ekspresja (bright); + słaba ekspresja (dim); +/- ekspresja tylko u części komórek; - brak ekspresji

niąc raczej funkcje regulatorowe odpowiedzi immunologicznej.

Defekty genetyczne warunkujące zaburzenia komórek NK.

Ze względu na rolę, jaką pełnią komórki NK w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, jakiegokolwiek zaburzenia dotyczące tych komórek mogą prowadzić do zaburzeń odporności, głównie przeciw-wirusowej, a tym samym do ciężkich chorób, a nawet śmierci chorego. Defekty komórek NK mogą dotyczyć każdego etapu ich dojrzewania, prowadząc do zaburzeń

zarówno ilościowych, jak i jakościowych, m.in.: zmniejszenia cytotoksyczności, nieprawidłowej produkcji i uwalniania ziarnistości litycznych. Dotychczas opisano szereg zaburzeń dotyczących komórek NK, zarówno ilościowych jak i funkcjonalnych, których wynikiem jest wysoka podatność na zakażenia wirusowe, szczególnie wirusami z rodziny Herpesviridae.

Najlepiej poznanym przykładem jednostek chorobowych, w których dochodzi do znacznego zmniejszenia się liczby większości komórek układu immunologicznego, a w tym komórek NK, są różne postacie

ciężkiego złożonego niedoboru odporności (ang. severe combined immunodeficiency disease, SCID). Są to wrodzone niedobory odporności spowodowane różnymi defektami molekularnymi, charakteryzujące się upośledzeniem lub brakiem odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Kliniknie, pacjenci z zaburzeniami typu SCID cierpią na ciężkie infekcje wirusowe zagrażające ich życiu, białaczki i zaburzenia cytogenetyczne związane z upośledzeniem funkcji limfocytów [34,35]. Mogą temu towarzyszyć m.in.: zatrzymanie wzrostu, wystąpienie zaburzeń w układzie kostno-szkieletowym oraz zaburzeń neurologicznych jak ślepota korowa czy dystonia. Jak dotąd opisano kilkanaście mutacji, które mogą doprowadzić do SCID. Dziedziczą się one autosomalnie recesywnie lub w sposób związany z płcią. Na podstawie zaburzeń w liczbie i funkcjonowaniu komórek NK można wyodrębnić 4 podstawowe fenotypy SCID, w których komórki NK są albo nie są obecne: (1) SCID T-B+NK-, (2) T-B+NK+, (3) T-B-NK-, (4) T-B-NK+ [85].

Niedobory białek AK2 i ADA (fenotyp T-B-NK-). Białko AK2 pełni rolę w produkcji adenozynotrifosforanu (ADP), a jego niedobór związany jest z dysgenezą siateczki, objawiającą się zaburzeniami różnicowania komórek limfoidalnych oraz mieloidalnych [25-26]. Natomiast deaminaza adenylowa (ADA), uczestniczy w metabolizmie puryn, a jej mutacja prowadzi do gromadzenia toksycznego dla niedojrzałych limfocytów metabolitu, czego efektem jest limfopenia (<500 komórek/ μ l krwi), powodując obniżenie liczby komórek T, B i NK [21-22].

Niedobór IL-2R γ i JAK3 (fenotyp T-B+NK-). W przypadku defektu JAK3 obserwuje się mutację kinazy tyrozynowej Jak3, przekazującej sygnał przez łańcuch γ c (ang. com-

mon γ chain) stanowiącej podjednostkę receptora dla interleukiny 2, 4, 7, 9, 15 i 21 (czyli także cytokin niezbędnych dla prawidłowego rozwoju komórek NK) [27]. Pacjenci z tym niedoborem cierpią na brak komórek T i NK przy obecności nieprawidłowo funkcjonujących limfocytach B [28-30]. Z kolei defekt receptora IL-2R α /CD25 prowadzi do niedoboru limfocytów T i komórek NK [31,32,33].

Dobrze poznane są także izolowane defekty liczby komórek NK. Mutacja genu dla białka MCM4 prowadzi do izolowanego niedoboru komórek NK, dotyczący głównie subpopulacji CD56dim [51]. Białko to pełni ważną rolę w inicjacji replikacji DNA. Pacjenci z mutacją MCM4 wykazują prawidłowy poziom limfocytów T i B, przy niewielkiej ilości krążących komórek NK, głównie CD56dim [52]. W komórkach CD56bright, obecnych w prawidłowej liczbie, zaobserwowano zaburzenia proliferacji pod wpływem IL-2 i IL-15. Niedobór MCM4 powoduje zaburzoną replikację DNA, prowadzącą do niestabilności genetycznej i gromadzenia aberracji chromosomalnych. Pacjenci cierpiący na ten niedobór prezentują wzmożoną niedoczynność kory nadnerczy, która oprócz zwiększonej podatności na infekcje wirusowe, stanowi charakterystyczny objaw tej choroby [53]. Zaburzenie liczby komórek NK może także wynikać z mutacji genu dla białka STAT5b. STAT5b, będący przekaźnikiem sygnału i aktywatorem transkrypcji, jest zaangażowany w kaskadę przekazu sygnału od receptorów dla hormonu wzrostu, IL-2 czy IL-15 [36]. Pacjenci z niedoborem STAT5b posiadają obniżony poziom komórek T i NK oraz słabą cytotoksyczność częściowo powodowaną małą ilością tych komórek [37-41]. Wykazano, iż zaburzenia molekularne

zarówno STAT5a jak i STAT5b prowadzą do wzmożonej śmierci komórek oraz do degradacji DNA, ale przy zachowaniu prawidłowego cyklu komórkowego [42]. Klinicznie pacjenci cierpią z powodu ciężkiego śródmiąższowego zapalenia płuc, krwotocznej ospy wietrznej, atopii oraz zwiększonej podatności na choroby autoimmunizacyjne w młodym wieku [76].

Zaburzenia liczby komórek NK obserwuje się także w przypadku niedoboru GATA-2. Autosomalnie dominujący, dziedziczny niedobór GATA2 powoduje infekcje *Mycobacterium* sp., związane z brakiem komórek dendrytycznych, monocytów, limfocytów B i komórek NK [43-49]. W wyniku tego defektu dochodzi do apoptozy komórek NK CD56bright, skutkując w ten sposób znacznym spadkiem liczby komórek NK CD56dim [50]. Pacjenci z tym niedoborem cierpią z powodu częstych infekcji wirusowych, białaczek pochodzenia mieloidalnego czy zaburzeń cytogenetycznych.

Poza zaburzeniami ilościowymi obserwuje się wiele jednostek chorobowych z zaburzeniami funkcji komórek NK. Objawiają się one głównie zmniejszeniem cytotoksyczności komórek NK przy zachowaniu ich prawidłowej liczby.

Najlepiej opisanym izolowanym niedoborem funkcji komórek NK jest defekt epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16 związany z mutacją w genie FCGR3A, kodującym ten receptor. Dzieci, u których wykryto tą mutację (polegającą na substytucji 230 nukleotydu, skutkującą zamianą 48 aminokwasu łańcucha białkowego z leucyny na histydynę) cierpiały na ciężkie i nawracające zakażenia wirusami z rodziny Herpesviridae, głównie wirusem opryszczki pospolitej, wirusem ospy wietrznej i półpaśca oraz wirusem Epsteina-Barr (EBV) [86-88]. Jednakże

nowsze badania wskazują, iż zmiana 230 nukleotydu w genie kodującym receptor CD16, jest raczej naturalnie występującym polimorfizmem niż chorobotwórczą mutacją [58].

Przetrwała infekcja wirusem EBV jest także obserwowana u pacjentów, u których wykryto mutację w genie PRKCD, kodującym kinazę białkową Cδ. Kinaza ta należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych, które odgrywają kluczową rolę w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. Białko to jest kluczowe w regulacji proliferacji limfocytów B, odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał oraz w funkcjonowaniu komórek NK, przetrwała infekcją wirusem EBV – u pacjentów tych obserwuje się także podwyższony poziom immunoglobulin (hipergammaglobulinemię) oraz zespół limfoproliferacyjny, podobny do autoimmunizacyjnego syndromu limfoproliferacyjnego (ALPS) [90, 91].

Obniżony poziom naturalnej cytotoksyczności komórek NK obserwuje się także u pacjentów z niedoborem białka NEMO. Niedobór ten jest spowodowany mutacją w genie IKBKG, sprzężonym z chromosomem X, który to koduje inhibitor podjednostki γ (IKK- γ) kinazy NF- κ B, nazywany także białkiem NEMO (ang. NF- κ B essentials modulator), regulującym aktywność jednego z najważniejszych czynników transkrypcyjnych jakim jest NF- κ B [53, 54]. Mutacja w genie kodującym NEMO może być przyczyną zespołu anhidrotycznej dysplazji ektodermalnej, często przebiegający z niedoborem immunologicznym. Objawia się skąpym owłosieniem, brakiem uzębienia i podatnością na zakażenia bakteryjne [55].

Innym zaburzeniem komórek NK związa-

nych z ich funkcją, ale wywołanym mutacją białek niezwiązanych z samą komórką NK, tak jak niedobór białka NEMO, jest zespół nagich limfocytów (ang. Bare lymphocyte syndrome, BLS). Jest to choroba związana z autosomalnie recesywną mutacją w genach TAP1 i TAP2, które kodują białka transportujące (ang. Transporters associated antigen-processing,), przenoszące peptydy antygenowe do siateczki śródplazmatycznej. Mutacja ta skutkuje brakiem białek TAP, prowadząc do braku załadunku peptydów do cząsteczek i zmniejszenia powierzchniowej ekspresji cząsteczek MHC klasy I. U pacjentów z tą chorobą dochodzi do zmniejszenia liczby cytotoksycznych limfocytów T, przy prawidłowej liczbie komórek NK, które to jednak wykazują znacznie zredukowaną cytotoksyczność. Do charakterystycznych objawów klinicznych należą: nawracające zakażenia bakteryjne i zmiany ziarninujące.

Natomiast w zespole limfoproliferacyjnym związanym z chromosomem X (ang. X-linked lymphoproliferative disorder, XLP) obserwuje się mutacje w genach SH2D1A i XIAP (ang. X-linked inhibitor of apoptosis), odpowiadające za dwa zespoły tego typu – odpowiednio, XLP1 i XLP2. SH2D1A koduje białko SAP (ang. SLAM-associated protein), które to jest cytoplazmatycznym białkiem adaptorowym [63, 64]. SAP wykazuje ekspresję w limfocytach T, NKT (ang. natural-killer T lymphocytes) oraz komórkach NK, hamując przekaz sygnału od receptorów z rodziny SLAM (ang. signalling lymphocytic activation molecule) [65]. Niedobór białka SAP związany z mutacją w tym genie powoduje dysfunkcję komórek NK i limfocytów T, głównie CD8+, objawiający się

najczęściej nadmierną proliferacją tych komórek i „zespołem burzy cytokin” oraz brakiem limfocytów NKT [66, 67]. Natomiast zespół XLP-2 jest związany z mutacją w genie XIAP kodującym białko o takiej samej nazwie, będące inhibitorem apoptozy. Zespół XLP charakteryzuje się niekontrolowaną proliferacją limfocytów T po zakażeniu wirusem EBV, która jednak nie prowadzi do skutecznej eliminacji wirusa. Pacjenci wykazują także zmniejszoną aktywność i liczbę komórek NK [68].

Opisano także choroby genetyczne skutkujące zaburzeniami w produkcji i uwalnianiu ziarnistości komórek NK, czego przykładem może być zespół Papillon-Lefevre’a. Jest to rzadka choroba genetyczna, dziedziczona autosomalnie recesywnie, związana z mutacją w genie CTSC, kodującym katepsynę C będącą lizosomalną proteazą [59]. Katepsyna C bierze udział w tworzeniu granzymów A i B [60,61]. W związku z niedoborem kinazy C, pacjenci cierpią na zaburzoną cytotoksyczność komórek NK [62]. Objawia się to hiperkeratozą dłoni i stóp w pierwszych miesiącach życia oraz zapaleniem przyzębia skutkującym utratą zębów.

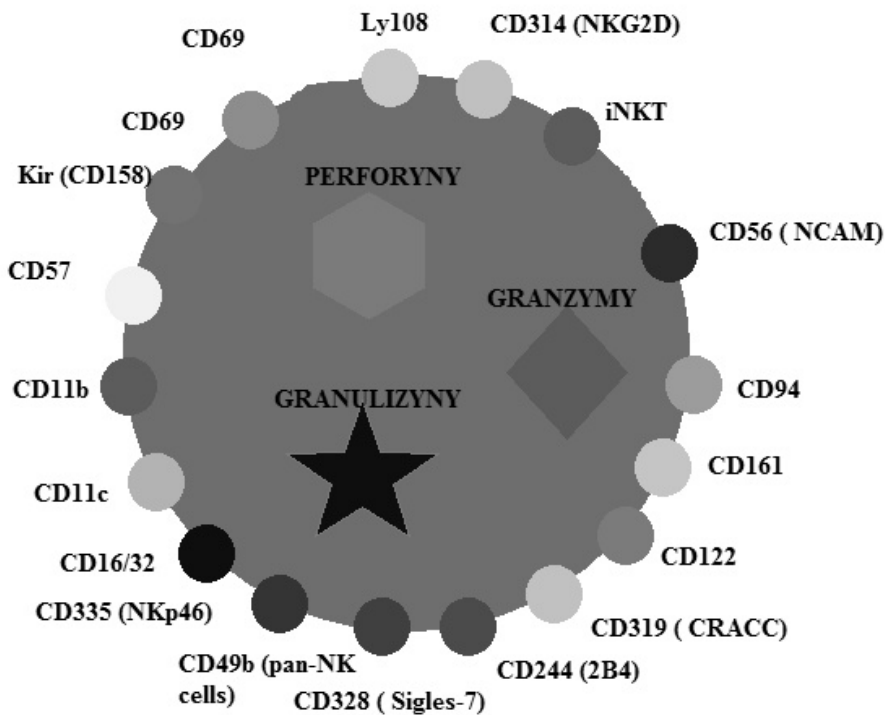
Inną jednostką chorobową, w której defekt komórek NK związany jest z ich ziarnistościami, to anomalia May’a Hegglinga. Jest to dziedziczona autosomalnie dominująco mutacja w genie MYH 9, kodującym niemięśniowy łańcuch ciężki miozyny. Charakteryzuje się ona wystąpieniem małopłytkowości, obecnością dużych płytek i ciałek Dohlego. Dodatkowo w komórkach NK dochodzi do defektu ich cytotoksyczności, w wyniku nieprawidłowej lokalizacji ziarnistości litycznych, objawia-

jącej się wewnątrzkomórkowymi zakażeniami bakteryjnymi [23].

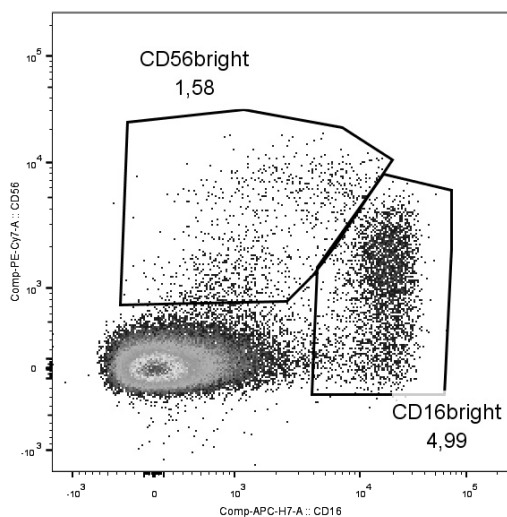
Podsumowanie

Układ odporności człowieka jest obecnie jednym z najintensywniej badanych, co skutkuje nie tylko szybko postępującym poszerzaniem obecnego stanu wiedzy, ale i odkrywaniem coraz to nowszych zaburzeń genetycznych odpowiadających za niedobory odporności. Dzięki temu udało się

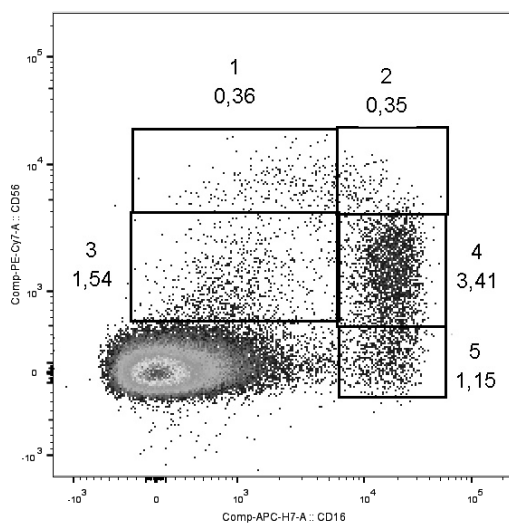
wykazać, jak ważną rolę pełnią w naszym organizmie komórki NK, niegdyś pomijane i uważane za mało znaczący element układu immunologicznego. Defekt nawet pojedynczej subpopulacji tych komórek może prowadzić do nieoczekiwanych poważnych zaburzeń odporności. Precyzyjna diagnostyka niedoboru odporności jest zatem bardzo istotna, ponieważ wczesne wykrycie choroby umożliwia skuteczniejsze leczenie i lepsze rokowanie dla pacjenta.



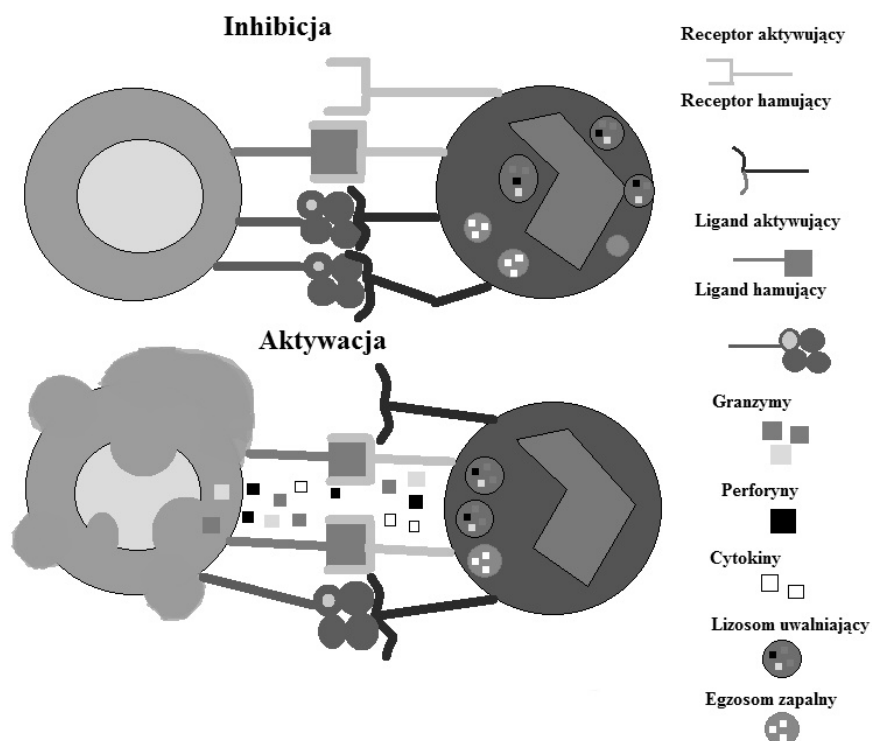
Rys.1 Receptory komórek NK



Rys.2 A Przedstawienie podziału komórek NK na dwie subpopulacje w zależności od ekspresji molekuł CD16 i CD56.



Rys.2B Przedstawienie podziału komórek NK względem ekspresji markera CD16/ FcγRA1 i CD56



Rys.4 Przedstawienie procesu inhibicji i aktywacji komórek NK.

Bibliografia

- [1] Trinchieri G.: Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989, 47, 187-376
- [2] Spits H., Lanier L. L., Phillips J. H.: Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995, 85, 2654-2670.
- [3] Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R., Mingari M. C., Moretta L.: Receptors for HLA CLASS-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14: 619-648.
- [4] Raulet D. H., Held W.: Natural killer cell receptors: the odds and ons of NK cell recognition. *Cell* 1995, 82, 697-700.
- [5] Gumperz J. E., Parham P.: The enigma of the natural killer cell. *Nature* 1995, 378, 245-248.
- [6] Lanier L.: NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, 16, 359-393.
- [7] Caligiuri M. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112:461-9.
- [8] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-40.
- [9] Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J et al. Characterization of CD56/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:2886-91.
- [10] Ruggeri L., Capanni M., Casucci M., Volpi L., Tosti A., Perruccio K., Urbani E., Negrin R. S., Martelli M. F., Velardi A.: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999, 94, 333-339.
- [11] Scott P., Trinchieri G.: The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7, 34-40.
- [12] Biron C. A.: Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 1997, 9, 24-34.
- [13] Robertson M. J., Ritz J.: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990, 76, 2421-2438.
- [14] Nagler A., Lanier L. L., Cwirla S., Phillips J. H.: Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 1989, 143, 3183-3191.
- [15] Jacobs R., Hintzen G., Kemper A., Beul K., Kempf S., Behrens G., Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright NK cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3121-6.
- [16] Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162:4511-20.
- [17] Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101:3052-7.
- [18] Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143:3183-91.
- [19] Andre' P, Spertini O, Guia S et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulphated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:3400-5.
- [20] Aure lie Poli,1 Tatiana Michel,1 Maud The' re'sine,1 Emmanuel Andre's,2 Francis Hentges1 and Jacques Zimmer1, CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset, 2009 Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 12
- [21] Blackburn MR, Kellems RE. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol.* 2005; 86:1-41. [PubMed: 15705418]
- [22] Lee HJ, Pyo JO, Oh Y, Kim HJ, Hong SH, Jeon YJ, et al. AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat Cell Biol.* 2007 Nov; 9(11): 1303-10. [PubMed: 17952061]
- [23] Immunologia ; Autorky: Jakub Gołab , Marek Jakóbsiak , Witold Lasek , Tomasz Stokłosa ; Wydawnictwo PWN ; Warszawa 2012, wyd.6
- [24] Niedzwiedzka-Rystwej P, Herberg M., Deptuła W.: Biology and role of NK cells - selected data. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2012; 37: 399-404
- [25] Lagresle-Peyrou C, Six EM, Picard C, Rieux-Laucat F, Michel V, Itidati A, et al. Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat Genet.* 2009 Jan; 41(1):106-11. [PubMed: 19043416]
- [26] Heltzer ML, Paessler M, Raffini L, Bunin N, Perez EE. Successful haploidentical bone marrow transplantation in a patient with reticular dysgenesis: three-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Oct; 120(4):950-2. [PubMed: 17854878]
- [27] Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M, et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science.* 1994 Nov 11; 266(5187):1042-5. [PubMed: 7973658]
- [28] Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell.* 1993 Apr 9; 73(1):147-57. [PubMed: 8462096]
- [29] Macchi P, Villa A, Gillani S, Sacco MG, Fratтини A, Porta F, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature.* 1995 Sep 7; 377(6544):65-8. [PubMed: 7659163]
- [30] Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science.* 1995 Nov 3; 270(5237):797-800. [PubMed: 7481768]
- [31] 67. Puel A, Ziegler SE, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 1998 Dec; 20(4):394-7. [PubMed: 9843216]
- [32] Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1; 94(7):3168- 71. [PubMed: 9096364]
- [33] Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med.* 2013 Mar 11; 210(3):433-43. [PubMed: 23440042]
- [34] Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, et al. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr.* 1997 Mar; 130(3):378-87. [PubMed: 9063412]
- [35] Stephan JL, Vlekova V, Le Deist F, Blanche S, Donadieu J, De Saint-Basile G, et al. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr.* 1993 Oct; 123(4):564-72. [PubMed: 8410508]
- [36] Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene.* 2000 May 15; 19(21):2566-76. [PubMed: 10851055]
- [37] Scaglia PA, Martinez AS, Feigerlova E, Bezrodnik L, Gaillard M, Di Giovanni D, et al. A novel missense mutation in the SH2 domain of the STAT5B gene results in a transcriptionally inactive STAT5b associated with severe IGF-I deficiency, immune dysfunction, and lack of pulmonary disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May; 97(5):E830-9. [PubMed: 22419735]
- [38] Vidarsdottir S, Walenkamp MJ, Pereira AM, Karperien M, van Doorn J, van Duyvenvoorde HA, et al. Clinical and biochemical characteristics of a male patient with a novel homozygous STAT5b mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Sep; 91(9):3482-5. [PubMed: 16787985]
- [39] Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med.* 2003 Sep 18; 349(12):1139-47. [PubMed: 13679528]
- [40] Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: an unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *J Pediatr.* 2011 May; 158(5):701-8. [PubMed: 21414633]
- [41] Bernasconi A, Marino R, Ribas A, Rossi J, Ciacchio M, Oleastro M, et al. Characterization of immunodeficiency in a patient with growth hormone insensitivity secondary to a novel STAT5b gene mutation. *Pediatrics.* 2006 Nov; 118(5):e1584-92. [PubMed: 17030597]
- [42] Behbod F, Nagy ZS, Stepkowski SM, Karras J, Johnson CR, Jarvis WD, et al. Specific inhibition of Stat5a/b promotes apoptosis of IL-2-responsive primary and tumor-derived lymphoid cells. *J Immunol.* 2003 Oct 15; 171(8):3919-27. [PubMed: 14530308]
- [43] Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang XN, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med.* 2011 Feb 14; 208(2):227-34. [PubMed: 21242295]
- [44] Calvo KR, Vinh DC, Maric I, Wang W, Noel P, Stetler-Stevenson M, et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica.* 2011 Aug; 96(8):1221-5. [PubMed: 21508125]
- [45] Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood.* 2011 Sep 8; 118(10):2656-8. [PubMed: 21765025]
- [46] Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood.* 2011 Sep 8; 118(10):2653-5. [PubMed: 21670465]
- [47] Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2011 Aug; 96(8):1081-3. [PubMed: 21810969]
- [48] Camargo JE, Lobo SA, Hsu AP, Zerze CS, Wormser GP, Holland SM. MonoMAC Syndrome in a Patient With a GATA2 Mutation: Case Report and Review of the Literature. *Clin Infect Dis.* 2013 Sep; 57(5):697-9. [PubMed: 23728141]
- [49] Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood.* 2012 Feb 2; 119(5):1283-91. [PubMed: 22147895]
- [50] Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, Makedonas G, Rosen JB, Dropulic L, et al. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood.* 2013 Apr 4; 121(14):2669-77. The authors report that GATA2 deficiency is associated with the specific lack of NK CD56bright subset and an

impaired function of the NK CD56dim population. [PubMed: 23365458]

[51] Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:333-74. [PubMed: 12045100]

[52] Gineau L, Cognet C, Kara N, Lach FP, Dunne J, Veturi U, et al. Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J Clin Invest.* 2012 Mar 1; 122(3):821-32. The authors describe the first genetic etiology associated with isolated NKD, partial autosomal recessive MCM4 deficiency. The mutation leads to the lack of prevention of re-replication and genomic instability. The NKD is characterized by a strong decrease of NK CD56dim subset but a normal count of NK CD56bright subset but with a decreased proliferation ability. [PubMed: 22354167]

[53] Hughes CR, Guasti L, Meimaridou E, Chuang CH, Schimenti JC, King PJ, et al. MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J Clin Invest.* 2012 Mar 1; 122(3):814-20. [PubMed: 22354170]

[54] Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM (2000) A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet* 67:1555-1562

[55] Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwright S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Heaton DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israel A, Courtois G, Casanova JL (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 27:277-285

[56] Orange JS, Brodeur SR, Jain A, Bonilla FA, Schneider LC, Kretschmer R, Nurko S, Rasmussen WL, Kohler JR, Gellis SE, Ferguson BM, Strominger JL, Zonana J, Ramesh N, Ballas ZK, Geha RS (2002) Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-gamma/NEMO mutations. *J Clin Invest* 109:1501-1509

[57] Orange JS (2006) Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6:399-409

[58] Lenart M, Trzyna E, Rutkowska M, Bukowska-Strakova K, Szaflarska A, Pituch-Noworolska A, Szczepanik A, Zembala M, Siedlar M. The loss of the CD16 B73.1/Leu11c epitope occurring in some primary immunodeficiency diseases is not associated with the FcgammaRIIIa-48L/R/H polymorphism. *Int J Mol Med.* 2010;26(3):435-42.

[59] Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, Hewitt C, Moynihan L, Roberts E, Woods CG, Markham A, Wong M, Widmer R, Ghaffar KA, Pemberton M, Hussein IR, Temtam SA, Davies R, Read AP, Sloan P, Dixon MJ, Thakker NS (1999) Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet* 23:421-424

[60] Smyth MJ, McGuire MJ, Thia KY (1995) Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *J Immunol* 154:6299-6305

[61] Pham CT, Ley TJ (1999) Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8627-8632

[62] Meade JL, de Wynter EA, Brett P, Sharif SM, Woods CG, Markham AF, Cook GP (2006) A family with Papillon-Lefevre syndrome reveals a requirement for cathepsin C in granzyme B activation and NK cell cytolytic activity. *Blood* 107:3665-3668

[63] Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Ohashi T, Howell GR, Bye JM, Cahn AP, Durham J, Heath P, Wray P, Pavitt R, Wilkinson J, Leversha M, Huckle E, Shaw-Smith CJ, Dunham A, Rhodes S, Schuster V, Porta G, Yin L, Serafini P, Sylla B, Zollo M, Franco B, Bolino A, Seri M, Lanyi A, Davis JR, Webster D, Harris A, Lenoir G, de St Basile G, Zylia D, Jones A, Behloradsky BH, Achatz H, Murken J, Fassler R, Simegi J, Romeo G, Vaudin M, Ross MT, Meindl A, Bentley DR (1998) Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 20:129-135

[64] Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G, Latour S (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444:110-114

[65] Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL (2009) SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 9:39-46

[66] Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE, Purtilo DT (1980) Deficient natural killer cell activity in x-linked lymphoproliferative syndrome. *Science* 210:543-545

[67] Snow AL, Marsh RA, Krummey SM, Roehrs P, Young LR, Zhang K, van Hoff J, Dhar D, Nichols KE, Filipovich AH, Su HC, Bleesing JJ, Lenardo MJ (2009) Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest* 119:2976-2989

[68] [Primary immunodeficiencies predisposed to Epstein-Barr virus-driven haematological diseases

[69] Brady M.T., MacDonald A.J., Rowan A.G., Mills K.H.: Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 3448-3457

[70] Brockman M.A., Kwon D.S., Tighe D.P., Pavlik D.F., Rosato P.C., Sela J., Porichis F., Le Gall S., Deneka D., Waring M.T., Moss K., Jensen H., Pereyra F., Kavanagh D.G., Walker B.D., Kaufmann D.E.: IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood*, 2009; 114: 346-356

[71] Brooks D.G., Trifilo M.J., Edelmund K.H., Teyton L., McGavern D.B., Oldstone M.B.: Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.*, 2006; 12: 1301-1309

[72] Hyodo N., Nakamura I., Imawari M.: Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004; 135: 462-466

[73] Nurdan A.T.: Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, 2011; 105: S13-S33

[74] [38] Shaw M.H., Kamada N., Warner N., Kim Y.G., Nunez G.: The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol.*, 2011; 32: 73-79

[75] Deptula W., Sliwa-Dominik J.: Immunity in viral infections - selected data. *Adv. Agr. Sci.*, 2010; 13: 83-88

[76] Nadeau K., Hwa V., Rosenfeld R.G.: STAT5b Deficiency: An Unsuspected Cause of Growth Failure, Immunodeficiency, and Severe Pulmonary Disease. *The Journal of Pediatrics*, 2011: 701

[77] Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechsler M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* 1999;162(8):4511-20.

[78] Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007;220:169-82.

[79] Moretta L, Montaldo E, Vacca P, Del Zotto G, Moretta F, Merli P, Locatelli F, Mingari MC. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(4):253-64.

[80] Zingoni A, Sornasse T, Cocks B G, Tanaka Y, Santoni A, Lanier L L. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *The Journal of Immunology.* 2004;173(6):3716-3724.

[81] Huard B, Früh K. A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *Eur J Immunol.* 2000 Feb;30(2):509-15.

[82] Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* 2006 Jun;18(3):151-8.

[83] Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigsmann A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O. Inhibition of the Nkp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):515-23.

[84] Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by Nkp44 but not by Nkp30. *Eur J Immunol.* 2001 Sep;31(9):2680-9.

[85] Buckley RH, Schiff RL, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, Roberts JL, Puck JM. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr.* 1997;130(3):378-87.

[86] de Vries E, Koene HR, Vossen JM, Gratama JW, von dem Borne AE, Waaijer JL, Haraldsson A, de Haas M, van Tol MJ. Identification of an unusual Fcγ receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood.* 1996;88(8):3022-7.

[87] Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol.* 1996;103(3):408-13.

[88] Kankirawatana S, Dai Y and Atkinson P. A six year old girl with recurrent varicella infections associated with a mutation in CD16 (FCGR3A, FcγRIIIa). *World Allergy Organization Journal.* 2007;134:abstract 420.

[89] Voskoboinik I, Whisstock J C, Joseph A T. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology.* 2015; 15:388-400.

[90] H.S. Kuehn, J. E. Niemela, A. Rangel-Santos, M. Zhang, S. Pitaluga, J. L. Stoddard, A. A. Hussey Mo. O. Ebuomwan, D. A. Long Priel, D. B. Kuhns, C. L. Park, T. A. Fleisher, G. Uzel, J. B. Oliveira. Loss-of-function of the protein kinase C δ (PKCδ) causes a B-cell lymphoproliferative syndrome in humans. *Blood.* 2013 Apr 18; 121(16): 3117-3125.

[91] Belot, Paul R. Kasher, E. W. Trotter, A. Foray, A. Debaud, G. I. Rice, M. Szykiewicz, M. Zabat, I. Rouvet, S. S. Bhaskar, S. B. Daly, J. E. Dickerson, J. Mayer, J. O'Sullivan, L. Juillard, J. E. Urquhart, S. Fawdar, A. A. Marusiak, N. Stephenson, B. Waszkowicz, M. B. W. Beresford, L. G. Biesecker, G. C. M. Black, C. Rene, J. Eliaou, N. Fabien, B. Ranchin, P. Cochot, P. M. Gaffney, F. Rozenberg, P. Lebon, Ch. Malcus, Y. J. Crow, J. Brognard, N. Bonnefoy, Protein Kinase C Deficiency Causes Mendelian Systemic Lupus Erythematosus With B Cell-Defective Apoptosis and Hyperproliferation. *Arthritis & Rheumatism Vol. 65, No. 8, August 2013, pp 2161-2171 DOI 10.1002/art.38008.*

Jak science wspomaga fiction, czyli w jakim stopniu technologie inżynierii genetycznej przybliżyły wizję de-ekstynkcji.

Iwona Kowalczyk

Studenckie Koło Naukowe Genetyki Nowotworów

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną Katedry Genetyki Medycznej

I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

iw.kowalczyk92@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr hab. n. med. Agaty Filip

De-ekstynkcja, czyli próba przywrócenia świata różnych wymarłych gatunków, zyskuje w ostatnim czasie coraz więcej rozgłosu, między innymi z uwagi na fakt, że pojawiające się technologie inżynierii genetycznej otwierają w tej dziedzinie nowe możliwości. Począwszy od technik zwiększających wydajność izolacji kopalnego DNA, poprzez sposoby jego amplifikacji i sekwencjonowania, aż wreszcie poznawanie całych genomów, stopniowo przybliżamy realizację tego planu. Przełomowym dokonaniem było zsekwencjonowanie genomu mitochondrialnego wymarłej kwagi, a następnie poznawanie genomów innych gatunków. Wielkie nadzieje pokłada się w enzymach restrykcyjnych, zwłaszcza działających w systemie CRISPR/Cas9, pozwalających coraz efektywniej edytować genomy żyjących zwierząt będących bliskimi krewnymi. Poza edycją genomu, stosowane są też techniki selektywnego rozrodu wstecznego i transferu jąder komórkowych.

Każdy gatunek wymaga osobnego rozpatrzenia pod kątem dostępności materiału, wyboru metody i szans na realizację de-ekstynkcji. Kwestia ta pozostawia jednak nadal wiele pytań natury etycznej, ekologicznej, finansowej i społecznej, dlatego też wątpliwe jest, czy kiedykolwiek w pełni uda się odtworzyć wymarłą populację. Zamiast tego, techniki tu wykorzystywane można zastosować przy zwiększaniu szans na przeżycie gatunków zagrożonych wyginięciem lub w dziedzinach takich jak medycyna lub rolnictwo.

Wstęp

Próby odtworzenia wymarłych gatunków sięgają już lat 30-tych XX wieku, kiedy to dwaj niemieccy zoologowie, bracia Heinz i Lutz Heck, próbowali drogą selektywnego rozrodu wstecznego odtworzyć populację tura europejskiego (*Bos primigenius*) i tarpana (*Equus ferus ferus*) [1, 2]. Jednakże ówczesny stan wiedzy o genetyce był niewystarczający, aby eksperyment można

było uznać za udany. Co więcej, skuteczność tej metody wymaga długiego czasu, podczas gdy bracia uznali efekt za osiągnięty po upływie nieco ponad dekady [1, 3a, 4, Tab.1].

De-ekstynkcja (ang. de-extinction) jest pojęciem utworzonym w 2012 roku, które obejmuje szeroko pojęte metody zmierzające do najwierniejszego odtworzenia po-

populacji wymarłych gatunków [2]. Jednakże jeszcze przed pełnym zdefiniowaniem, po raz pierwszy zostało użyte prawdopodobnie w książce Piers'a Anthony'ego *The Source of Magic* z 1979 roku [3b]. Za synonimiczne można uznać określenia takie jak 'odwrócenie wymierania' (ang. extinction reversal) lub 'odrodzenie' (ang. revival). W marcu 2013 roku, jako wynik współpracy trzech organizacji non-profit : TED (ang. Technology, Entertainment and Design), National Geographic Society oraz Revive & Restore, odbyła się całonocna konferencja obejmująca serię wykładów wybitnych naukowców, w czasie której przybliżali oni tematykę de-ekstynkcji, tym samym czyniąc zagadnienie bardziej popularnym [2, 3c, 5].

Możliwe drogi

Zależnie od gatunku i czasu jego wymarcia, w kwestii de-ekstynkcji spekuluje się przydatność następujących metod: selektywnego rozrodu wstecznego, transferu jąder komórkowych oraz połączenia tej ostatniej z techniką edycji genomu [6]. Pierwsza z metod, w której naukę w znacznej mierze wyręcza ewolucja, została wykorzystana między innymi w projekcie odtworzenia populacji kwagi właściwej (*Equus quagga quagga*). Projekt trwa od 1987 roku i obejmuje już piąte pokolenie młodych, u których redukcja pasków coraz bardziej przypomina umaszczenie kwagi [7, Fig.1]. Skuteczność metody umożliwia fakt, że kwaga właściwa to w istocie podgatunek wywodzący się z gatunku zebry stepowej [8]. Innym przykładem jest plan odtworzenia populacji tura, którym kieruje holenderski naukowiec Henri Kerkdijk-Otten [3d]. Transfer jąder komórkowych może być przeprowadzony z wykorzystaniem żywych komórek i gatunków żyjących gatunków [3e]. W przyszłości źródłem genomów mogą okazać się tzw. zamrożone zoo, gdzie w ciekłym azocie przechowywane są gamety i embriony gatunków zagrożonych wyginięciem [9]. Dla wielu jest to jednak

nieosiągalne i oznacza, że genom wymaga uprzedniej rekonstrukcji. Punktem wyjścia będzie wówczas uzyskiwany ze szczątków DNA kopalny (ang. fossil DNA, fDNA) lub starożytny (ang. ancient DNA, aDNA), który wymaga specjalnych metod obróbki [10].

Pozyskiwanie materiału

Pierwszym przypadkiem pracy z aDNA było ustalenie genomu mitochondrialnego wspomnianej kwagi [8]. Z uwagi na warunki przechowywania, a także brak mechanizmów naprawczych w martwych tkankach, praca z aDNA jest problematyczna, zaś DNA endogenne zwykle stanowi mniej niż 1% całkowitego pozyskanego materiału genetycznego [11,12]. W związku z tym, opracowano specjalne protokoły, zwiększające wydajność izolacji aDNA ze sproszkowanego materiału. Przykładem może być metoda wykorzystująca związanie DNA z krzemionką w obecności izotocyjanianu guanidyny, której jedną z zalet jest rozdzielenie badanego materiału i potencjalnych inhibitorów reakcji PCR [13]. Inny przykład to protokół wskazujący na korzystne działanie „nadtrawiania” materiału przed właściwym trawieniem enzymatycznym trwającym dobowo, w roztworze zawierającym m.in. EDTA, który (dla temperatury 50 stopni Celsjusza i czasu 1 h), zwiększa stosunek DNA endogennego w badanych próbkach nawet 2,7-krotnie [14]. Nie bez znaczenia pozostaje też rodzaj wykorzystywanej tkanki [15, Fig.2]. Wykazano na przykład, że z zewnętrznej warstwy korzeni zęba można pozyskać nawet do 14 razy więcej DNA w porównaniu z wewnętrzną zębina [14].

Poziom molekularny

Kolejnym po izolacji krokiem jest zwielokrotnienie uzyskanego materiału. Przed odkryciem metody PCR w 1983 roku, do namnażania DNA wykorzystywano kolonie bakteryjne [3f]. Metoda PCR, z uwagi na szereg zalet, znalazła wiele zastosowań,

również w dziedzinie archeologii [16, 17, 3g]. W przypadku gatunków wymarłych, praca wymaga zastosowania starterów o sekwencji stałej dla wszystkich zwierząt kręgowych lub dla gatunku najbliższego spokrewnionego [18]. Innymi stosowanymi metodami mogą być real-time PCR, nested PCR lub whole genome amplification [10]. W 2006 roku, z wykorzystaniem metody emulsion PCR oraz technologii SBS (sequencing by synthesis), możliwe stało się dokładne określenie oraz lokalizacja zmian, jakim ulegały zasady w aDNA [19]. Rok później opublikowano pracę, w której, z wykorzystaniem metody CSR (ang. compartmentalized self-replication), otrzymano polimerazy łączące cechy trzech gatunków rodzaju *Thermus*, o wydajności i czułości wobec pochodzącego z epoki Plejstocenu aDNA, a także termostabilności znacznie przewyższających polimerazę Taq [20, 21]. W 2007 roku opracowano również metodę opartą na wydłużaniu pojedynczych starterów (single primer extension -based, SPEX), której największą zaletą była zdolność do rozróżniania błędnego parowania wywołanego upływem czasu od błędów polimerazy, tym samym zapewniając znacznie bardziej wiarygodny materiał do późniejszego sekwencjonowania [22].

Problem genomu

Z uwagi na artefakty wywołane procesami rozpadu aDNA, jeszcze w 2001 roku, aby uwierzytelnić prawidłowość sekwencji, należało dokonać kilku niezależnych reakcji PCR, co było kosztowne i czasochłonne [23]. Rozważając hipotetyczne sekwencjonowanie mitochondrialnego genomu niedźwiedzia jaskiniowego z wykorzystaniem ówczesnych możliwości, zajęłoby to dziesiątki tysięcy lat pracy [24]. Obecne technologie czynią ten proces osiągalnym czasowo: w 2008 roku, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji, z włosów mamuta uzyskano 80% sekwencji genomu jądrowego i był to pierwszy genom jądrowy uzyskany z aDNA [25]. Jednakże

nawet genomy jakiegokolwiek z żyjących organizmów nie są obecnie zsekwencjonowane w 100%, a to za sprawą niemalże niemożliwych na dzień dzisiejszy do sekwencjonowania fragmentów genomu, jak heterochromatyna lub centromery [3h, 26]. Choć udało się już uzyskać syntetyczne centromery ludzkich chromosomów, składowanie genomu wymarłego osobnika wiąże się ze zbyt wieloma trudnościami, by można je było rozważać w kategoriach osiągalności w najbliższym czasie [27, 26, 3i].

Transfer jąder komórkowych

Transfer jąder komórkowych (somatic cell nuclear transfer, SCNT) jest metodą, która powszechnie znana jest pod mniej precyzyjnym pojęciem „klonowania” i która pozwoliła w 1996 roku przyjść na świat owcy Dolly, pierwszemu ssakowi, który rozwinął się z pozbawionej jądra komórki somatycznej dorosłego osobnika [28]. Powyższą procedurę można odnieść również do gatunków wymarłych, jeżeli dysponujemy ich nienaruszonymi genomami. Przykładem są narodziny w 2003 roku zwierzęcia o hiszpańskiej nazwie bucardo, będącego podgatunkiem gatunku koziorożców pirenejskich (*Capra pyrenaica*). Jądra pobrano z komórek pozyskanych z tkanek ostatniej samicy, Celii, zmarłej w 2000 roku. Jako surogatki wykorzystano koziorożce hiszpańskie lub ich hybrydy z kozami domowymi. Urodzone z jedynej donoszonej ciąży młode zmarło wkrótce po narodzinach ze względu na zniekształcone płuca [29]. Podobne projekty miały miejsce wcześniej (np. dla zagrożonego wyginięciem muflona śródziemnomorskiego), jednak młode nie dożywały wieku dorosłego [30]. Transfer jąder komórkowych pozostaje długotrwałym i żmudnym sposobem z niezwykle małą wydajnością i ryzykiem niepowodzenia na każdym z etapów. Dla opisanego wyżej przykładu bucardo, przy założeniu, że zakończył się on powodzeniem, wskaźnik powodzenia/porażki wynosiłby 0,1% [3j].

CRISPR/Cas9 i edycja genomu

W 2012 roku, na mini konferencji w Wyss Institute w Cambridge, światowej sławy inżynier genetyczny George Church przedstawił hipotetyczną drogę de-ekstynkcji, która pozwala ominąć krok składania całego genomu, wykorzystując genomy obecnie żyjących bliskich krewnych zwierząt jako matryce. Należy zidentyfikować odcinki genomu decydujące o różnicach między osobnikami i w tych miejscach dokonać zmian [3k]. Uzyskanie komórek, w których doszło do ekspresji wprowadzonych genów, byłoby etapem równoważnym z pobraniem tkanek zwierzęcia, pozostałe kroki byłyby identyczne jak dla metody SCNT. O tym, że geny wymarłych osobników są aktywne *in vivo*, świadczą wyniki eksperymentu z 2008 roku, w którym element wzmacniający transkrypcję genu *Col2A1*, pochodzący od wilka workowatego, doprowadził do ekspresji genu reporterowego u mysich płodów [31, Fig.3]. Trwa poznawanie genów o kluczowym znaczeniu dla cech fenotypowych niektórych zwierząt, na przykład genu *TRPV3* u mamuta, który wykazuje plejotropowy wpływ na termoregulację, porost włosów i rozmieszczenie tkanki tłuszczowej [32]. Analizie poddawana jest też cząsteczka hemoglobiny występująca u mamuta i kodujący ją gen. Wykazano na przykład, że powinowactwo do tlenu mamuciej hemoglobiny jest mniej wrażliwe na zmiany temperatury niż tej samej cząsteczki u słonia indyjskiego [33].

Metody edycji genomu wykorzystują samoistny proces naprawy uszkodzonego DNA. Doprowadzając do pęknięć obydwu nici (DBS - double - stranded breaks), inicjują jedną z dwóch dróg naprawy: poprzez homologię (HDR - homology - derived repair) i łączenie niehomologicznych końców (NHEJ - non - homologous end - joining) [34]. W przypadku de-ekstynkcji przydatna może okazać się pierwsza z nich, w której rolę nici matrycowej do naprawy, w naturalnych warunkach zapewnianej przez chromosom homologiczny, pełniłby egzo-

genny aDNA dostarczony do komórki [31]. Narzędziem, które umożliwi realizację tego planu są enzymy restrykcyjne, z których w najpowszechniejszym użyciu znajdują się: nukleazy palców cynkowych (ZFNs - zinc-finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases) oraz najnowsza z nich, system CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) [34]. Dwie pierwsze metody znalazły zastosowanie między innymi w medycynie: dzięki nukleazom palców cynkowych i delecji genu receptora chemokin, CCR5, udało się uzyskać *in vivo* linie komórek odpornych na infekcję wirusem HIV [35]. Jednakże zarówno jeden, jak i drugi enzym mają swoje ograniczenia, takie jak określona ilość miejsc naprawy lub rozmiar cząsteczki [34]. Lepszym rozwiązaniem wydaje się CRISPR/Cas9. Odkryty w genomach bakterii jako wynik koewolucji między bakterią a fagiem, służy do usuwania obcego DNA [36]. CRISPR/Cas9 działa w następujący sposób: materiał genetyczny patogenu cięty jest na fragmenty (tzw. protospacer sequences) i włączany w genom bakterii. Sekwencje te są następnie transkrybowane jako crRNA (CRISPR RNA), które wraz z nukleazą bakteryjną Cas9 oraz trans-aktywującym RNA (tracrRNA) tworzą kompleks wiążący obcy genom. Nukleaza, ta sama u różnych gatunków bakterii, łączy się z gatunkowo specyficzną sekwencją zwaną PAM (protospacer adjacent motif) i przecina obie nici obcego DNA na wysokości 3 par zasad powyżej motywu PAM [34]. Zalety systemu to m.in. możliwość jednoczesnej zmiany kilku loci w genomie oraz łatwość w programowaniu enzymów [36, 34]. Niemniej, wciąż występuje ryzyko zajścia niepożądanego mutagenyzy, co próbuje się niwelować m.in. poprzez skracanie długości protospacer RNA [37]. Na dzień dzisiejszy, zespołowi profesora Churcha udało się otrzymać komórki słonia, w których za pomocą CRISPR/Cas9 dokonano zmiany 14 genów na



Fig.1 Samica Jemima i młode TJ13 – prawo własności autorskiej należy do Quagga Project Association, publikacja za zgodą koordynatora projektu, Pana Craiga Lardnera.



Fig.2 Młody mamut- model (własność Muzeum Historii Naturalnej w Wiedniu, fotografia własna, publikacja za pozwoleniem). W żadnych z odnalezionych mamucich szczątków nie zachowała się dostateczna ilość sierści mamuta, by wystarczyło jej do wykonania rekonstrukcji. Włosy w tym przypadku to w istocie sierść bydła rasy Highland Cattle – szkockie bydło górskie.



Fig.3 Wilk workowaty (*Thylacinus cynocephalus*) – eksponat będący własnością Muzeum Historii Naturalnej w Wiedniu, fotografia własna, publikacja za pozwoleniem.



Fig.4 Gołąb wędrowny (*Ectopistes migratorius*) - eksponat będący własnością Muzeum Historii Naturalnej w Wiedniu, fotografia własna, publikacja za pozwoleniem.

CECHA PORÓWNAWCZA	TUR	BYDŁO HECKA
WYSOKOŚĆ W KŁĘBIE	SAMCE: średnio 1,7 m SAMICE: średnio 1,5 m	SAMCE: średnio 1,42 m SAMICE: średnio 1,31 m
UMASZCZENIE	SAMCE: ciemnobrązowe po czarne, jasna pręga wzdłuż grzbietu SAMICE: czerwonoróżowe, rzadko czarne CIEŁĘTA: czerwonoróżowe, rzadko czarne Różnica w umaszczeniu płci wyraźnie zaznaczona.	SAMCE: od czarnego nakrapianego po czerwone, brązowe, szare, czarne SAMICE: jasnoróżowe, czerwone, szare, czarne CIEŁĘTA: czerwonoróżowe Różnica w umaszczeniu płci zwykle niewyraźna.
ROGI	Charakterystyczne, względnie długie i cienkie, zagięte w kierunkach do przodu i do wewnątrz.	Delikatnie zagięte, względnie cienkie i krótkie, zagięte wyraźnie ku górze, często przypominające kształtem lirę.
BUDOWA CIAŁA	Przypomina kwadrat (długość kończyn mniej-więcej równoważy długość tułowia). Wyraźnie zaznaczona różnica w objętości między przednią a tylną połową ciała.	Z powodu względnie krótkich kończyn, ciało wydaje się być długie, plan budowy przypomina prostokąt. Niewielka różnica względem objętości przedniej i tylnej połowy ciała.
GŁOWA	Względnie długa i wąska.	Względnie krótka i szeroka.
WYMIĘ	Małe, prawie niewidoczne.	Zróznicowane, zarówno małe, jak i duże.

Tab. 1 – Porównanie cech morfologicznych tura (*Bos taurus primigenius*) i bydła Hecka. Na podstawie: Table 1. *Physical characteristics of the aurochs as compared with those of Heck cattle* w Vuure, T. van (2002). History, morphology and ecology of the Aurochs (*Bos taurus primigenius*). Lutra 45(1): 3-17. Wykorzystano za zgodą Autora.

pochodzące od mamuta [38]. Znane są sukcesy wykorzystania metody w medycynie i rolnictwie [39, 40].

Pierwotne komórki zarodkowe

De-ekstynkcja ptaków stanowi dla naukowców wyzwanie. Specyfika ich rozrodu wyklucza wykorzystanie gamet jako obiektu manipulacji genetycznych. W tym przypadku celem będą pierwotne komórki zarodkowe (primordial germ cells, PGCs),

które wędrują przez układ krwionośny zarodka do będących w początkowej fazie rozwoju gonad. Ma to miejsce w pierwszej dobie po tym, jak jajo zostanie zniesione. Osobniki w pierwszym pokoleniu zachowują morfologię gatunku, bowiem zmieniane są jedynie ich gamety. Dopiero osobniki drugiego pokolenia mogą prezentować odmienne cechy fenotypowe. Znacznym ułatwieniem jest to, że PGCs, w przeciwieństwie do komórek somatycz-

nych, nie wymagają re-programowania. Powyższy plan będzie wykorzystany w przypadku projektu przywrócenia populacji gołębia wędrownego (*Ectopistes migratorius*) [3m, Fig.4]. Również genom mitochondrialny gołębia wędrownego został zsekwencjonowany [41]. PGCs mogą być hodowane *in vitro* i szlaki sygnalizacji międzykomórkowej między nimi są coraz lepiej poznawane [42]. Z wykorzystaniem nowego systemu transpozonowego o nazwie piggyBac udało się uzyskać długotrwałą ekspresję białka GFP (green fluorescent protein) w komórkach PGC kurczaków, co stwarza możliwości bardziej wydajnej produkcji komórek transgeniczných [43]. Z kolei przeszkodę, jaką stanowi mały odsetek pozyskiwanych komórek w organizmach osobników *in vivo*, próbuje się zniwelować, programując również za pomocą systemu piggyBac zarodki kurcząt, u których migracja endogennych PGC byłaby upośledzona [3n, 44].

Wnioski

Zdobycze techniki i nauki coraz bardziej przybliżają wizję de-ekstynkcji, jednak otwartą kwestią pozostaje, czy na pewno powinna ona mieć miejsce. Pomyślnie za-

kończenie działań na poziomie molekularnym i komórkowym otwiera szereg pytań o dalsze losy organizmów. Obawy budzi samo ingerowanie w naturę i naturalny przebieg ewolucji, a także losy osobników: znalezienie matki zastępczej, rozwój i wychowanie a także wpływ na istniejące ekosystemy [26, 4].

Prawdopodobnie jednym z lepszych rozwiązań byłoby wykorzystanie dostępnych metod de-ekstynkcji w służbie żyjących obecnie gatunków zagrożonych wyginięciem. Przykładem może być populacja słonia indyjskiego, wśród osobników której wprowadzone mamucie wersje genów zwiększyłyby szanse na przetrwanie w chłodniejszym klimacie [38]. Metody te znajdują też zastosowanie w terapii chorób (np. pierwotnych zespołów niedoboru odporności) lub w badaniach przesiewowych [34, 36].

De-ekstynkcja wymaga dalszego postępu technologii, który uczyni ją łatwiej osiągalną, a także szerokiego rozpatrzenia pod kątem problemów etycznych, społecznych, finansowych i środowiskowych. Z tych względów pozostaje ona nadal odległą w czasie wizją.

Bibliografia:

- [1] Vuure, T. van, History, morphology and ecology of the Aurochs (*Bos taurus primigenius*), *Lutra*, 2002, 45(1), 3-17.
- [2] Martinelli L., Oksanen M., Siipi H., De-extinction: a novel and remarkable case of bio-objectification, *Croatian Medical Journal*, 2014, 55(4), 423-7. doi:10.3325/cmj.2014.55.423.
- [3] How to clone a mammoth? The science of de-extinction, red. B. Shapiro, Princeton University Press, Princeton and Oxford, 2015
- [4] Friese C, Marris C., Making De-Extinction Mundane? Rose N, ed. *PLoS Biology*, 2014, 12(3):e1001825. doi:10.1371/journal.pbio.1001825
- [5] Seddon P. J., Moehrenschrager A., Ewen J., Reintroducing resurrected species: selecting DeExtinction candidates, *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(3), 140-7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.01.007>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534714000214>)
- [6] Carlin NF, Wurman I., Zakim T., How to permit your mammoth: some legal implications of 'De-Extinction', *Stanford Environm Law J.*, Forthcoming 2013. Available from:

- http://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2327369. Accessed: July 15, 2015
- [7] Oficjalna strona projektu Quagga Project: <http://www.quaggaproject.org/the-quagga-project.htm>
- [8] Leonard J. A., Rohland N., Glaberman S., Fleischer R.C., Caccone A., Hofreiter M., A rapid loss of stripes: the evolutionary history of the extinct quagga, *Biology Letters*, 2005, 1(3), 291-5 doi:10.1098/rsbl.2005.0323.
- [9] San Diego Frozen Zoo: http://www.sandiegozoo.org/what_we_do/banking_genetic_resources/frozen_zoo/
- [10] Analiza DNA - praktyka, red. R. Słomski, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2014, str. 243-261
- [11] Cooper A., Poinar H.N., Ancient DNA: Do It Right or Not at All, *Letters, Science* 18, 2000, 289(5482), 1139 DOI: 10.1126/science.289.5482.1139b
- [12] Carpenter M.L., Buenrostro J.D., Valdiosera C., et al., Pulling out the 1%: Whole-Genome Capture for the Targeted Enrichment of Ancient DNA Sequencing Libraries, *American Journal of Human Genetics*, 2013, 93(5), 852-864. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.002.
- [13] Rohland N., Hofreiter M., Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nat. Protocols* 2, 2007, 2(7)1756 -

1762 doi:10.1038/nprot.2007.247

- [14] Damgaard P.B., Margaryan A., Schroeder H., Orlando L., Willerslev E., Allentoft M.E., Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth, *Scientific Reports*, 2015, 5, 11184. doi:10.1038/srep11184.
- [15] Huynen L., Millar C.D., Lambert D.M., Resurrecting ancient animal genomes: The extinct moa and more, *BioEssays*, 2012, 34, 8, 661-669, Box 1: Sources of ancient DNA. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201200040>
- [16] Fox H.S., Parslow T.G., Polymerase Chain Reaction – A Novel Method for Analyzing Specific DNA Sequence, *The Western Journal Of Medicine*, 1988, 149, 5, 594-5
- [17] Pääbo S., Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(6), 1939-1943.
- [18] Analiza DNA – teoria i praktyka, red. R. Słomski, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2014, str. 389
- [19] Gilbert M.T.P., Binladen J., Miller W., et al., Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis, *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1), 1-10. doi:10.1093/nar/gkl483.
- [20] D' Abbadie M., Hofreiter M., Vaisman A., et al. Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA, *Nature biotechnology*, 2007, 25(8), 939-943. doi:10.1038/nbt1321.
- [21] Ghadessy F.J., Ong J.L., Holliger P., Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8), 4552-4557. doi:10.1073/pnas.071052198.
- [22] Brotherton P., Endicott P., Sanchez J.J., et al., Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions, *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(17), 5717-5728. doi:10.1093/nar/gkm588.
- [23] Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A. von, Pääbo S., DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(23), 4793-4799.
- [24] Der Sarkissian C., Allentoft M.E., Avila-Arcos M.C., et al., Ancient genomics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, 370(1660), 20130387. doi:10.1098/rstb.2013.0387.
- [25] Miller W. et al., Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth, *Nature*, 2008, 456, 7220, 387-390, <http://dx.doi.org/10.1038/nature07446>
- [26] Nicholls H., Darwin 2000: Let's make a mammoth, *Nature*, 2008, 456, 310-314 doi:10.1038/456310a
- [27] Nakano M., Cardinale S., Noskov V.N., et al., Inactivation of a Human Kinetochores by Specific Targeting of Chromatin Modifiers, *Developmental Cell*, 2008, 14(4), 507-522. doi:10.1016/j.devcel.2008.02.001.
- [28] Wilmut I. et al., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 1997, 385, 810-812
- [29] Folch J. et al., First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning, *Theriogenology*, 2009, 71, 1026-1034, doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.005
- [30] Ptak G. et al., Preservation of the Wild European Mouflon: The First Example of Genetic Management Using a Complete Program of Reproductive Biotechnologies, *Biology of Reproduction*, 2002, 66(3), 796-801. doi: 10.1095/biolreprod66.3.796
- [31] Pask A.J., Behringer R.R., Renfree M.B., Resurrection of DNA Function In Vivo from an Extinct Genome, Svensson E.I., ed. *PLoS ONE*, 2008, 3(5):e2240. doi:10.1371/journal.pone.0002240.
- [32] Lynch, Vincent J. et al., Elephantid Genomes Reveal the Molecular Bases of Woolly mammoth Adaptations to the Arctic, *Cell Reports*, 2015, 12(2) , 217 – 228 doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.027
- [33] Yuan Y., Shen T.J., Gupta P., et al., A Biochemical-Biophysical Study of Hemoglobins from Woolly Mammoth, Asian Elephant, and Humans, *Biochemistry*, 2011, 50(34), 7350-7360. doi:10.1021/bi200777j.
- [34] Ott de Bruin L.M., Volpi S., Musunuru K., Novel Genome-Editing Tools to Model and Correct Primary Immunodeficiencies, *Frontiers in Immunology*, 2015, 6, 250. doi:10.3389/fimmu.2015.00250.
- [35] Holt N., Wang J., Kim K., et al., Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo, *Nature biotechnology*, 2010, 28(8), 839-847. doi:10.1038/nbt.1663.
- [36] Koskella B., Research highlights for issue 6: the CRISPR/Cas revolution, *Evolutionary Applications*, 2015, 8(6), 525-6. doi:10.1111/eva.12279.
- [37] Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K., Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs, *Nature biotechnology*, 2014, 32(3), 279-284. doi:10.1038/nbt.2808.
- [38] Callaway E., Mammoth genomes hold recipe for Arctic elephants, *Nature*, 2015, 521, 18-19, doi:10.1038/nature.2015.17462
- [39] Kennedy E.M., Kornepati A.V.R., Goldstein M., et al., Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 Gene in Cervical Carcinoma Cells by Using a Bacterial CRISPR/Cas RNA-Guided Endonuclease, Sandri-Goldin R.M., ed. *Journal of Virology*, 2014, 88(20), 11965-11972. doi:10.1128/JVI.01879-14.
- [40] Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Nekrasov V., Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system, *Plant Methods*, 2013, 9, 39. doi:10.1186/1746-4811-9-39.
- [41] Hung C.-M., Lin R.-C., Chu J.-H., Yeh C.-F., Yao C.-J., Li S.-H., The De Novo Assembly of Mitochondrial Genomes of the Extinct Passenger Pigeon (*Ectopistes migratorius*) with Next Generation Sequencing, Hofreiter M., ed. *PLoS ONE*, 2013, 8(2), e56301. doi:10.1371/journal.pone.0056301.
- [42] Macdonald J., Glover J.D., Taylor L., Sang H.M., McGrew M.J., Characterisation and Germline Transmission of Cultured Avian Primordial Germ Cells, Milstone D.S., ed. *PLoS ONE*, 2010, 5(11), e15518. doi:10.1371/journal.pone.0015518.
- [43] Jordan B.J. et al., Expression of green fluorescent protein in the chicken using in vivo transfection of the piggyBac transposon, *Journal of Biotechnology*, 2014, 173, 86-9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.01.016>.
- [44] Glover J.D., Taylor L., Sherman A., Zeiger-Poli C., Sang H.M., McGrew M.J., A Novel Piggybac Transposon Inducible Expression System Identifies a Role for Akt Signalling in Primordial Germ Cell Migration, Cooney A.J., ed. *PLoS ONE*, 2013, 8(11), e77222. doi:10.1371/journal.pone.0077222.

Chemeryna: pomost pomiędzy metabolizmem a odpornością

Daniel Krochmal, Kamila Kwiecień

Zakład Immunologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen”

dan.krochmal@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr Mateusza Kwitniewskiego, Zakład Immunologii, WBBiB UJ

Chemeryna jest wielofunkcyjnym białkiem z rodziny adipokin odgrywającym ważną rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Chemeryna stanowi czynnik chemotaktyczny dla leukocytów posiadających receptor CMKLR1. Szereg badań sugeruje udział chemeryny w pewnych schorzeniach autoimmunizacyjnych, takich jak łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów czy stwardnienie rozsiane. Z drugiej strony równoległe badania wskazują na udział chemeryny w rozwoju tkanki tłuszczowej poprzez stymulację różnicowania i dojrzewania adipocytów. Podniesiony poziom chemeryny zaobserwowano u pacjentów cierpiących na otyłość, która jest związana z występowaniem chronicznego, systemowego stanu zapalnego. Stawia to chemerynę w roli potencjalnego łącznika między stanem zapalnym a schorzeniami związanymi z syndromem metabolicznym.

Wprowadzenie

Chemeryna jest białkowym produktem genu RARRES2 (ang. retinoic acid receptor responding 2), znanego także jako TIG2 (ang. tazarotene-induced gene 2). Pierwsze informacje na temat tego genu pochodzą z późnych lat dziewięćdziesiątych. Zidentyfikowano wtedy sekwencję DNA, której ekspresja była indukowana przez tazaroten – lek stosowany w łuszczycy [1]. Kilka lat później chemeryna została odkryta na nowo jako ligand receptora CMKLR1 [2]. Jej pierwszą zaobserwowaną biologiczną funkcją była indukcja chemotaksji leukocytów do miejsca wystąpienia stanu zapalnego. Ma ona miejsce dzięki oddziaływaniu z receptorem CMKLR1 (ang. chemokine-like receptor 1), który ulega ekspresji w licznych populacjach ssaczych komórek eukariotycznych, w tym m.in. w niektórych leukocytach. Sam receptor należy do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (ang. G protein-coupled receptors, GPCR). [2–4]. Chemeryna zalicza się także do adipokin – białek sygnałowych wydzielanych przez białą tkankę tłuszczową (ang. white adipose tissue, WAT). Znaczenie chemeryny jako białka regulatorowego przejawia się w stosunkowo szerokim zakresie jej działania. Obejmuje ono między in-

nymi: (1) Regulację rekrutacji komórek układu odpornościowego, takich jak pDC (ang. plasmacytoid dendritic cells), makrofagi oraz komórki NK (ang. natural killers) do miejsc wystąpienia stanu zapalnego [1,19,20]. Należy przy tym zaznaczyć, że w przypadku niektórych modeli badawczych zaobserwowano także działanie przeciwstawne polegające na hamowaniu migracji leukocytów, co sugeruje dwojaki, czyli prozapalny i przeciwzapalny charakter działania tego białka [3,5]. (2) Regulacja proliferacji i różnicowania komórek tłuszczowych [6,7]. (3) Regulacja metabolizmu glukozy i lipidów dojrziałych adipocytów poprzez wpływ na poziom transportera glukozy GLUT4 oraz DGAT2 - enzymu uczestniczącego w syntezie trójglicerydów, a także wpływ na insulinoooporność [6]. (4) Stymulacja angiogenezy, polegająca na pobudzeniu podziałów komórek endotelium i uwalnianiu metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 odpowiedzialnych za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej [8].

Ekspresja chemeryny na wysokim poziomie ma miejsce w białej tkance tłuszczowej, wątrobie i łożysku, zaś na niższym poziomie także w skórze, trzustce, drogach oddechowych, jelitach, nerkach i nadnerczach. Frakcją komórek cha-

rakteryzującą się całkowitym brakiem ekspresji chemeryny są leukocyty. Z tego powodu regulacja rozwoju stanu zapalnego przez chemerynę może odbywać się na osi tkanka-leukocyty, lecz nie na osi leukocyty-leukocyty [9].

Obecnie podejrzewa się istotny udział chemeryny zarówno w szeregu zaburzeń metabolicznych, do których zalicza się otyłość, zespół metaboliczny, czy cukrzyca typu II, jak i w chorobach o charakterze autoimmunizacyjnym, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i łuszczycy. Zaproponowany został także związek pomiędzy zwiększoną ekspresją chemeryny a otyłością i towarzyszącym jej chronicznym, ogólnoustrojowym stanem zapalnym [10].

Struktura chemeryny

Struktura przestrzenna chemeryny nie została jeszcze rozwiązana ani metodami krystalografii rentgenowskiej, ani NMR, a obecne przypuszczenia oparte są o analizy bioinformatyczne. Charakterystyczną jej cechą wydaje się być obecność ugrupowania spotykanego w strukturze cystatyn (cystatin-like fold), będących grupą inhibitorów proteaz cysteinowych. Stanowi je β -arkusz złożony z pięciu antyrównoległych łańcuchów owinięty wokół N-końcowej α -helisy. Struktura jest stabilizowana przez dwa mostki disiarczkowe [11]. Chemeryna wydaje się wykazywać odstępstwa od tego schematu. Z przewidywań wynika, że na arkusz β składają się jedynie dwa łańcuchy otaczające α -helisę zlokalizowaną w pobliżu C-końca oraz obecny jest dodatkowy mostek disiarczkowy. Przewidywana struktura trójwymiarowa chemeryny jest zatem swego rodzaju lustrzanym odbiciem struktury typowej chemokiny, jednakże wykazuje również pewne podobieństwo do trójwymiarowej struktury cystatyn [12].

Potranslacyjne modyfikacje

Po zakończeniu translacji chemeryna opuszcza rybosom w postaci pre-probiałka o długości 163 aminokwasów. N-koniec łańcucha peptydowego poddawany jest następnie proteolitycznej degradacji polegającej na usunięciu 20-aminokwasowego peptydu sygnałowego. Prowadzi to do powstania formy wydzielniczej, tzw. proche-

meryny, zbudowanej ze 143 aminokwasów (w przybliżeniu 18 kDa) (Ryc. 1). Prochemeryna charakteryzuje się jednak niską aktywnością biologiczną i wymaga dalszego działania enzymów proteolitycznych w obrębie C-końca [2]. Konieczność dokonania modyfikacji tego odcinka sugeruje, że odgrywa on kluczową rolę w interakcji z receptorem. W procesie tym uczestniczy szereg enzymów odpowiedzialnych także za przebieg procesów krzepnięcia, fibrynolizy oraz generowania stanu zapalnego, z których każdy poprzez hydrolizę wiązania peptydowego w obrębie C-końca prowadzi do powstania pochodnych o różnej długości łańcucha (Ryc. 1). Z kolei długość łańcucha determinuje poziom aktywności chemeryny [12,13]. Do grupy enzymów katalizujących utworzenie bioaktywnej formy chemeryny należą obecne w ziarnistościach neutrofilii: elastaza oraz katepsyny G, L i K [12,14]. Plazmina - enzym rozkładający fibrynę oraz tryptaza - proteaza serynowa obecna w ziarnistościach komórek tucznych odpowiadają za utworzenie formy o względnie niskiej aktywności [12], jednak kontynuacja obróbki przez karboksypeptydazy B i N prowadzi do powstania chemeryny-157 - najaktywniejszej znanej postaci [15]. Część enzymów proteolitycznych posiada zdolność inaktywacji aktywowanej wcześniej chemeryny. Do tych należy konwertaza angiotensyny (ang. angiotensin converting enzyme, ACE) uczestnicząca w regulacji ciśnienia tętniczego oraz chymaza - proteaza serynowa obecna w ziarnistościach komórek tucznych oraz bazofili. Oba wymienione białka modyfikują postać aktywną prowadząc do jej całkowitej inaktywacji (Ryc. 1) [16,17]. Podsumowując, aktywność chemeryny oraz lokalne stężenie formy biologicznie czynnej podlega kontroli przez skomplikowaną sieć enzymów proteolitycznych. Efekt zaś może zostać osiągnięty na drodze pojedynczych modyfikacji lub kooperacyjnego działania kilku enzymów.

Rola chemeryny w procesach zapalnych

Chemeryna jest białkiem o licznych funkcjach, jednak jedną z ważniejszych jest regulacja odpowiedzi immunologicznej w oparciu o zjawisko chemotaksji. Polega ona na rekrutacji leukocy-

tów posiadających receptor CMKLR1 do miejsc wystąpienia stanu zapalnego [2]. Stężenie chemeryny we krwi koreluje także z markerami stanu zapalnego [19]. Była to pierwsza zaobserwowana korelacja i proponowana rola chemeryny. Z tego powodu początkowo była ona traktowana jako czynnik wyłącznie prozapalny [2]. Jednak niedawne badania zasugerowały, że chemeryna może w pewnych okolicznościach wykazywać działanie przeciwzapalne i hamować rekrutację niektórych leukocytów [3,5]. Nie wszystkie typy komórek układu odpornościowego stanowią cel chemeryny. Do tej pory ekspresję receptora chemeryny zaobserwowano w komórkach NK oraz w części komórek prezentujących antygen – makrofagach i niedojrzałych pDC [2,20,21]. Natomiast do komórek nieposiadających receptora CMKLR1, toteż niewrażliwych na chemerynę zalicza się bazoofile, eozynofile oraz limfocyty B i T [9].

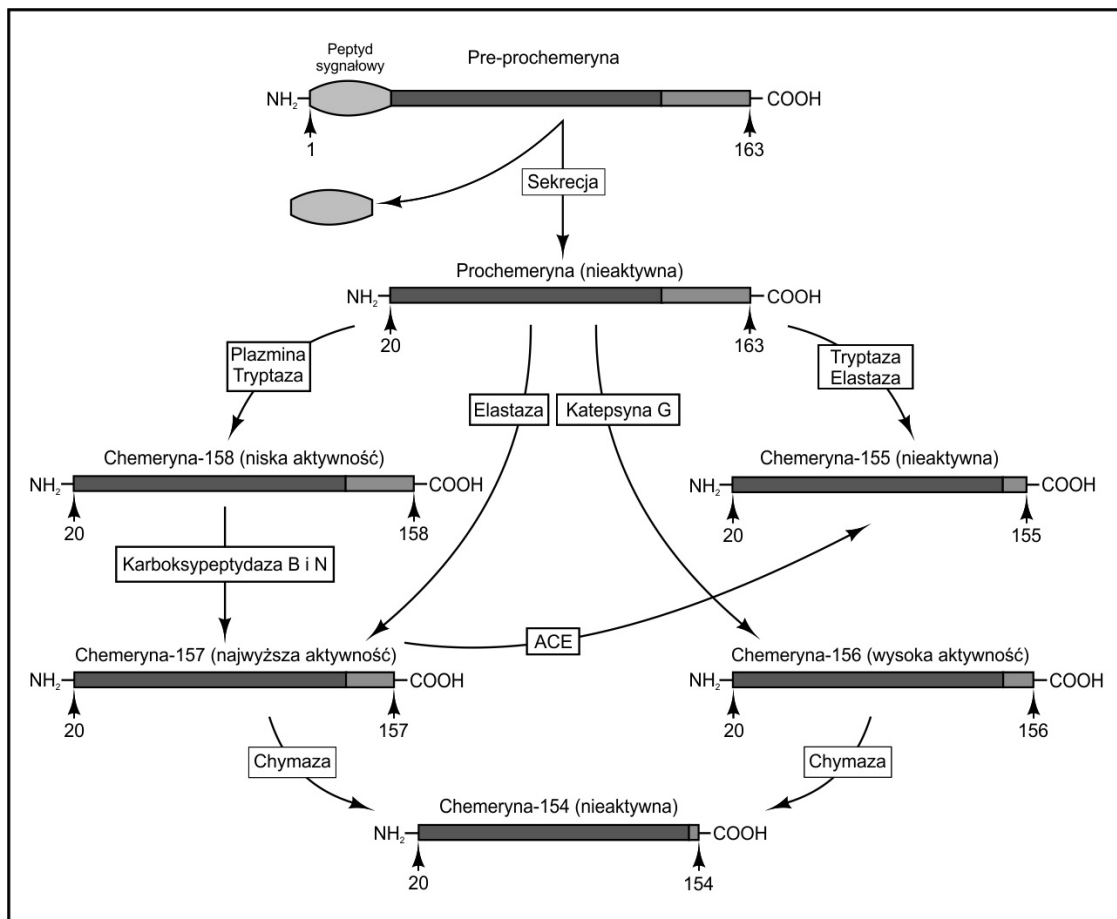
Obecnie białko to jest szczególnie intensywnie badane pod kątem potencjalnego udziału w przewlekłych chorobach o charakterze autoimmunizacyjnym. Zaobserwowano bowiem zwiększoną aktywność leukocytów CMKLR1+ w obrębie zmian wywołanych przez te choroby. Do tego typu zaburzeń należą m.in. łuszczyca, reumatoidalne zapalenia stawów oraz stwardnienie rozsiane [22–25]. Badania materiału pobranego od łuszczyków wykazały zwiększoną migrację komórek NK oraz pDC do skóry zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry zdrowej, co może być spowodowane przez chemotaktycznie aktywną chemerynę. Z kolei cennych danych na temat stwardnienia rozsianego dostarczyły badania przeprowadzone na mysim modelu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu (EAE) – ostrej choroby demielinizacyjnej pod pewnymi względami przypominającej stwardnienie rozsiane u ludzi. Po pierwsze, u osobników chorych zaobserwowano wyższy poziom transkryptów chemeryny w rdzeniu kręgowym. Ponadto myszy pozbawione receptora chemeryny CMKLR1 charakteryzowały się mniejszą migracją makrofagów do zmian chorobowych, a objawy samej choroby także były łagodniejsze. Korelowało to z mniejszym uszkodzeniem mieliny niż u osob-

ników z funkcjonalnym receptorem [26]. Pełne poznanie sposobu działania chemeryny może mieć kluczowe znaczenie w zrozumieniu mechanizmu powstawania i terapii tych chorób.

Rola chemeryny w metabolizmie

Tkanka tłuszczowa oprócz roli ochronnej, izolacyjnej oraz magazynującej funkcjonuje jako narząd wydzielniczy odpowiedzialny za syntezę i sekrecję czynników regulatorowych, nazywanych adipokinami oraz cytokin prozapalnych (m.in. IL-1 β , IL-6 i TNF α). Jest to także przypuszczalnie jedno z najważniejszych źródeł chemeryny w krwiobiegu – adipocyty budujące tkankę tłuszczową są zdolne do jej produkcji i wydzielania. Jednocześnie komórki tłuszczowe syntezują receptor CMKLR1, co wskazuje na autokryny i parakryny charakter oddziaływania [6].

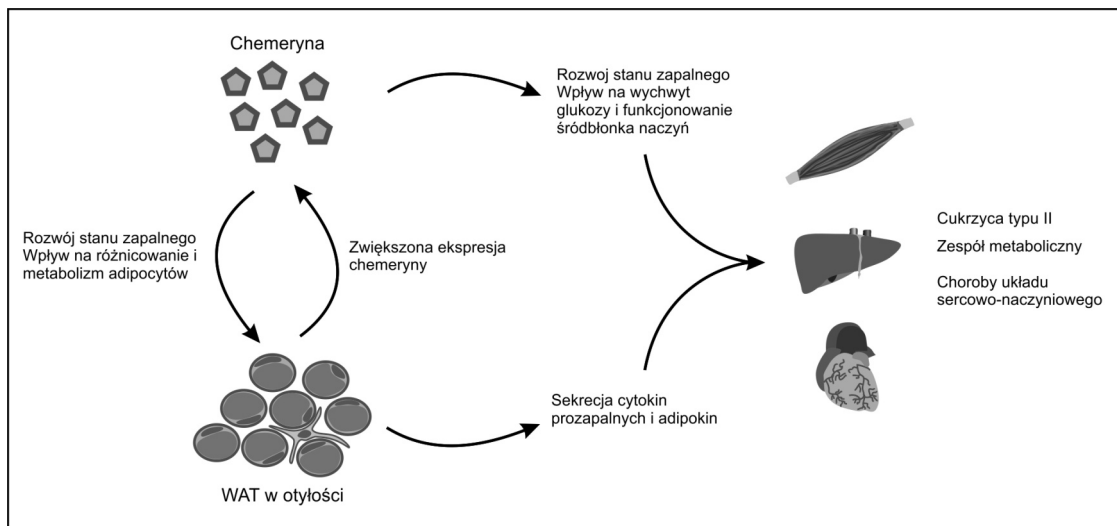
Obecnie wiadomo, że otyłość jest związana z umiarkowanym, chronicznym stanem zapalnym, o czym świadczą podniesione poziomy cytokin prozapalnych we krwi osób otyłych oraz wzmożona migracja leukocytów do tkanki tłuszczowej. Komórki te dodatkowo nasilają procesy zapalne poprzez dalszą produkcję cytokin [10,27]. Zwiększona ekspresja prozapalnych adipokin stanowi czynnik promujący wystąpienie metabolicznych dysfunkcji często łączonych z otyłością, takich jak zespół metaboliczny, który może być przyczyną rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy typu II (Ryc. 2). Związek ten wynika z zakłócania działania szlaków insulinowych przez cytokiny prozapalne (przede wszystkim TNF α i IL-1 β) produkowane przez tkankę tłuszczową i rezydujące w niej leukocyty, które wpływając na aktywność receptora insulinowego oraz białka adaptorowego IRS-1 (ang. insulin receptor substrate) prowadzą do zwiększonej insulinooporności [27]. W tym kontekście oraz po uwzględnieniu właściwości prozapalnych i chemotaktycznych chemeryna może odpowiadać za napływ leukocytów CMKLR1+ do przerośniętej tkanki tłuszczowej i – w konsekwencji – wywołanie w niej stanu zapalnego. Obecnie brakuje danych doświadczalnych potwierdzających tę tezę, jednak warto tutaj nadmienić, że w przypadku otyłości



Ryc. 1. Modyfikacje proteolityczne prochemeryny. Chemeryna jest syntezowana jako preprobiałko, które przekształcane jest do formy wydzielniczej (prochemeryny) wskutek usunięcia peptydu sygnałowego z N-końca. Prochemeryna nie wykazuje aktywności wobec receptora CMKLR1. Do jej aktywacji konieczna jest proteolityczna modyfikacja C-końca przez proteazy kaskad krzepnięcia, fibrynolizy i stanu zapalnego. Aktywacja może przebiegać poprzez pojedynczą modyfikację lub sekwencyjne cięcie przez różne enzymy. Znany jest szereg białek uczestniczących w obróbce C-końca, pośród których znajdują się enzymy aktywujące chemerynę (elastaza, karboksypeptydazy, katepsyny), enzymy katalizujące powstanie formy o niskiej aktywności oraz dezaktywujące postać aktywną. Za [18].

i cukrzycy typu II poziom tego białka jest we krwi podniesiony [8]. Z kolei w badaniach in vivo na myszach pozbawionych genu chemeryny obserwuje się zmniejszenie migracji makrofagów do tkanki tłuszczowej w porównaniu z myszami dzikimi [28]. Obecnie przypuszcza się, że chemeryna wraz z CMKLR1 jest kluczowa w procesie proliferacji i dojrzewania adipocytów, ponieważ ich ekspresja znacznie wzrasta u adipocytów w czasie adipogenezy. Badania przeprowadzone na komórkach z linii 3T3-L1 (fibroblastach fenotypowo przypominających preadipocyty) pokazały, że brak ekspresji jednego z tych białek skutkuje zahamowaniem proli-

feracji i różnicowania komórek [6]. W sprzeczności z tymi obserwacjami stoją wyniki badań in vivo przeprowadzonych na wspomnianych wcześniej myszach z pozbawionych genu chemeryny. Pokazały one, że wyciszenie ekspresji chemeryny nie wpływa na produkcję adipokina w preadipocytach, ani na masę ciała myszy [28]. Te same badania na linii 3T3-L1 sugerują, oprócz ważnej roli we wzroście tkanki tłuszczowej, udział chemeryny w regulacji metabolizmu cukrów i lipidów w dorosłych adipocytach. Wykazano bowiem, że wyciszenie ekspresji chemeryny koreluje ze spadkiem ekspresji GLUT4, leptyny i adiponektyny - białek kluczowych



Ryc. 2. Proponowany związek chemeryny z zespołem metabolicznym. Białko to stanowi potencjalny łącznik między układem immunologicznym a metabolizmem. Ekspresja chemeryny wzrasta w otyłości, czego skutkiem jest zwiększenie napływu leukocytów do tkanki tłuszczowej. Komórki te poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych mogą powodować zaburzenie sygnalizacji insulinowej innych komórek, zwane insulinoopornością. Konsekwencje jej wystąpienia mogą obejmować rozwój zespołu metabolicznego, cukrzycy typu II i chorób układu sercowo-naczyniowego. Jednocześnie podniesiony poziom chemeryny może wpływać na metabolizm adipocytów oraz promować dalszą adipogenezę. Z kolei stymulacja angiogenezy umożliwia powstanie nowych naczyń krwionośnych odżywiających nowopowstające obszary tkanki tłuszczowej. Za [18].

w metabolizmie tych związków [6]. Wpływ chemeryny na gospodarkę węglowodanami sugerują także badania *in vivo*, w których wykazano, że brak tego białka może prowadzić do zaburzeń wydzielania insuliny i tym samym spadku wychwytu glukozy z osocza [28]. Precyzyjne określenie roli chemeryny w regulacji metabolizmu cukrów i tłuszczów wymaga jednak dalszych badań.

Rola chemeryny w angiogenezie

Wzrost tkanki tłuszczowej pociąga za sobą konieczność wytworzenia nowych naczyń krwionośnych, które będą odżywiały nowopowstające obszary. Śródbłonek wyściełający naczynia jest miejscem ekspresji licznych białek m.in. istotnych dla właściwego formowania odpowiedzi immunologicznej i stanu zapalnego. Budujące go komórki endotelialne posiadają receptor CMKLR1, dlatego mogą odpowiadać na biologicznie czynną chemerynę. Jak wiadomo, stan zapalny wiąże się z podniesieniem poziomu cytokin prozapalnych w krwiobiegu, m.in. TNF α , IL-6, IL-1 β . Wykazano, że komórki śródbłonek odpowiadają na ten stan wzrostem ekspresji re-

ceptora CMKLR1. Skutkiem działania chemeryny na śródbłonek naczyń jest nasilenie proliferacji komórek oraz uwolnienie metaloproteinaz MMP-2 i 9. Białka te należą do endopeptydaz i stymulują proces angiogenezy poprzez degradację i remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej. [8]. Ponadto obserwacje mikroskopowe pozwoliły zaobserwować formowanie i wydłużanie nowych naczyń włosowatych oraz rozgałęzianie już istniejących pod wpływem chemeryny. Są to procesy krytyczne dla angiogenezy i wynikają z aktywacji przez chemerynę szlaku kinaz MAP odpowiedzialnego za regulację tempa podziałów komórkowych [8].

Konkluzje

Wiele badań przeprowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wskazuje na wielofunkcyjność chemeryny. Adipokina ta we współpracy z receptorem CMKLR1 bierze udział w rekrutacji komórek odpornościowych do zmian zapalnych, lecz także w innych procesach, takich jak regulacja funkcjonowania tkanki tłuszczowej jako organu endokrynnego oraz procesach metabolicznych. Badania wykazały,

że poziom ekspresji chemeryny wzrasta w otyłości. Jednocześnie białko to stymuluje różnicowanie adipocytów oraz angiogenezę, która jest procesem kluczowym dla rozwoju tkanki tłuszczowej. Chemotaktyczne właściwości chemeryny wywołują migrację leukocytów do tkanki tłuszczowej, co powoduje zwiększoną sekrecję cytokin prozapalnych i adipokin. Czynniki te mogą wpływać na metabolizm adipocytów oraz wywoływać niekorzystne ogólnoustrojowe efekty, takie jak wzrost insulinooporności, czy zaburzenie metabolizmu węglowodanów i lipidów. Są to czynniki sprzyjające rozwojowi zespołu

Bibliografia

- [1] S. Nagpal, S. Patel, H. Jacobs, D. DiSepio, C. Ghosn, M. Malhotra, et al., Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin, *J. Invest. Dermatol.* 109 (1997) 91-95.
- [2] V. Wittamer, J.-D. Franssen, M. Vulcano, J.-F. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, et al., Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 977-985. doi:10.1084/jem.20030382.
- [3] S. Luangsai, V. Wittamer, B. Bondué, O. De Henau, L. Rouger, M. Brait, et al., Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 183 (2009) 6489-6499. doi:10.4049/jimmunol.0901037.
- [4] W. Vermi, E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, et al., Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 509-515. doi:10.1084/jem.20041310.
- [5] J.L. Cash, R. Hart, A. Russ, J.P.C. Dixon, W.H. Colledge, J. Doran, et al., Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 767-775. doi:10.1084/jem.20071601.
- [6] K.B. Goralski, T.C. McCarthy, E.A. Hanniman, B.A. Zabel, E.C. Butcher, S.D. Parlee, et al., Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 28175-28188. doi:10.1074/jbc.M700793200.
- [7] S. Roh, S.-H. Song, K.-C. Choi, K. Katoh, V. Wittamer, M. Parmentier, et al., Chemerin-a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 1013-1018. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.104.
- [8] J. Kaur, R. Adya, B.K. Tan, J. Chen, H.S. Randeva, Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1762-1768. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.150.
- [9] B. Bondué, V. Wittamer, M. Parmentier, Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism, *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (2011) 331-338. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.11.004.
- [10] K. Bozaoglu, K. Bolton, J. McMillan, P. Zimet, J. Jowett, G. Collier, et al., Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome, *Endocrinology.* 148 (2007) 4687-4694. doi:10.1210/en.2007-0175.
- [11] M. Alvarez-Fernandez, Y.-H. Liang, M. Abrahamson, X.-D. Su, Crystal Structure of Human Cystatin D, a Cysteine Peptidase Inhibitor with Restricted Inhibition Profile, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 18221-18228. doi:10.1074/jbc.M411914200.
- [12] B.A. Zabel, L. Zuniga, T. Ohyama, S.J. Allen, J. Cichy, T.M. Handel, et al., Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response, *Exp. Hematol.* 34 (2006) 1021-1032. doi:10.1016/j.exphem.2006.05.003.
- [13] B.A. Zabel, S.J. Allen, P. Kulig, J.A. Allen, J. Cichy, T.M. Handel, et al., Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34661-34666. doi:10.1074/jbc.M504868200.
- [14] P. Kulig, T. Kanytko, B.A. Zabel, M. Banas, A. Chyra, A. Stefanska, et al., Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 187 (2011) 1403-1410. doi:10.4049/jimmunol.1002352.
- [15] X.-Y. Du, B.A. Zabel, T. Myles, S.J. Allen, T.M. Handel, P.P. Lee, et al., Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibi-

tor), and platelets, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 751-758. doi:10.1074/jbc.M805000200.
- [16] H. John, J. Hierer, O. Haas, W.-G. Forssmann, Quantification of angiotensin-converting-enzyme-mediated degradation of human chemerin 145-154 in plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 362 (2007) 117-125. doi:10.1016/j.ab.2006.12.001.
- [17] A. Guillabert, V. Wittamer, B. Bondué, V. Godot, V. Imbault, M. Parmentier, et al., Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1530-1538. doi:10.1189/jlb.0508322.
- [18] M.C. Ernst, C.J. Sinal, Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 21 (2010) 660-667. doi:10.1016/j.tem.2010.08.001.
- [19] A.B. Michael Lehrke, Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis, *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 161 (2009) 339-44. doi:10.1530/EJE-09-0380.
- [20] S. Parolini, A. Santoro, E. Marcano, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, et al., The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues, *Blood.* 109 (2007) 3625-3632. doi:10.1182/blood-2006-08-038844.
- [21] B.A. Zabel, A.M. Silverio, E.C. Butcher, Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 174 (2005) 244-251.
- [22] J. Skrzeczyńska-Moncznik, A. Stefańska, B.A. Zabel, M. Kapińska-Mrowiecka, E.C. Butcher, J. Cichy, Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin, *Acta Biochim. Pol.* 56 (2009) 355-360.
- [23] J. Skrzeczyńska-Moncznik, K. Wawro, A. Stefańska, E. Oleszycka, P. Kulig, B.A. Zabel, et al., Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (2009) 323-327. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.071.
- [24] R. Lande, V. Gafa, B. Serafini, E. Giacomini, A. Visconti, M.E. Remoli, et al., Plasmacytoid Dendritic Cells in Multiple Sclerosis: Intracerebral Recruitment and Impaired Maturation in Response to Interferon- β , *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 388-401. doi:10.1097/NEN.0b013e31816fc975.
- [25] K. Eisinger, S. Bauer, A. Schaffler, R. Walter, E. Neumann, C. Bucher, et al., Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Exp. Mol. Pathol.* 92 (2012) 90-96. doi:10.1016/j.yexmp.2011.10.006.
- [26] K.L. Graham, B.A. Zabel, S. Loghavi, L.A. Zuniga, P.P. Ho, R.A. Sobel, et al., Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 183 (2009) 6717-6723. doi:10.4049/jimmunol.0803435.
- [27] J.S. Yudkin, C.D.A. Stehouwer, J.J. Emeis, S.W. Coppack, C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue?, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 972-978. doi:10.1161/01.ATV.19.4.972.
- [28] M. Takahashi, Y. Okimura, G. Iguchi, H. Nishizawa, M. Yamamoto, K. Suda, et al., Chemerin regulates β -cell function in mice, *Sci. Rep.* 1 (2011). doi:10.1038/srep00123.

Prozdrowotny wpływ flory bakteryjnej na organizm człowieka

Paweł Krzyżek

Mikrobiologiczne Studenckie Koło Naukowe

Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytet Wrocławski

krojcerpawel@gmail.com

Praca napisana pod opieką dra Grzegorza Guły

Priorytetem każdego żywego organizmu jest utrzymanie homeostazy. W procesie koewolucji doszło do powstania niepowtarzalnej jednostki - holobiontu, utworzonej z makroorganizmu oraz flory bakteryjnej zasiedlającej jego tkanki. Dzięki tej symbiotycznej interakcji możliwe stało się odpowiednie zintegrowanie wszystkich funkcji życiowych oraz zagwarantowało adaptację do zmian środowiskowych. Pozornie dwa odrębne światy - gospodarz oraz mikrobiota mają możliwość molekularnego dialogu i dwukierunkowej komunikacji warunkującej zharmonizowane działanie. Flora bakteryjna spełnia kluczową rolę w dojrzewaniu oraz koordynowaniu funkcji układu pokarmowego, immunologicznego, endokrynnego i nerwowego. Z tego też powodu terapia bakteriami staje się coraz powszechniejsza, a kolejne badania coraz silniej ukazują prozdrowotny wpływ flory bakteryjnej na organizm człowieka.

Wstęp

Każdy żywy organizm by utrzymać stałość swojego środowiska wewnętrznego musi niezmiennie przystosowywać się do otoczenia na poziomie molekularnym, komórkowym oraz fizjologicznym [1]. Sposobem na utrzymanie homeostazy jest mutualistyczna relacja z florą bakteryjną. Najistotniejszym miejscem tej interakcji są jelita i to właśnie tu dochodzi do największej kolonizacji przez symbiotyczną florę [2]. Liczba bakterii sięga wartości 10^{13} - 10^{14} , a tym samym jest dziesięciokrotnie większa niż liczba komórek ludzkiego ciała [2,3]. Około 100 bilionów komórek związanych z ludzkim ciałem, ale nie będących ludzkiego pochodzenia, obejmuje 1-2 kg. Stanowi to istotną masę w porównaniu z masą mózgu, która wynosi średnio 1,5 kg. Symbiotyczna więź organizmu ludzkie-

go z mikroorganizmami, którą wspólnie obserwujemy ma długą historię ewolucji. Organizm, będący gospodarzem dla mikrobów nie jest bierny wobec zasiedlania swojego ciała i może działać jak swego rodzaju filtr, wybierając które bakterie będą miały możliwość ulokowania się w obrębie jego tkanek. Z drugiej strony mikroorganizmy również będą miały pewne preferencje w stosunku do rodzaju zasiedlanych gospodarzy [4].

Jedność działania mózgu, układu wydzielniczego i immunologicznego oraz mikrobioty jelitowej może być ujęta wspólnym łącznikiem jako wielokierunkowa sieć zależności warunkująca homeostazę. Molekuły zaangażowane w ten dialog to neurotransmitery, neuropeptydy, hormony endokrynne oraz cytokiny [5]. Brak prawidłowej flory jelitowej może skutkować pogorszeniem

tej relacji i przyczynić się do stanu patologicznego oraz rozwoju jednostek chorobowych. Dysfunkcja na poziomie „zapomnianego narządu” skutkuje bowiem nieprawidłowościami w funkcjonowaniu układu nerwowego, przemian metabolicznych, jak i układu pokarmowego [2].

Korzystna rola mikrobioty jelitowej

Początkowy okres życia jest czasem bardzo istotnym dla prawidłowego rozwoju flory jelitowej. Pionierscy „kolonizatorzy” dróg układu pokarmowego noworodka odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integralności interakcji mikrobiom-gospodarz. Jest to proces, który w dużej mierze determinuje zdrowie podczas niemowlęcego i dorosłego życia [6].

Zyskiem dla mikrobioty jest stała dostępność substancji odżywczych oraz odpowiednie dla ich rozwoju warunki fizykochemiczne: pH, warunki oksydacyjno-redukcyjne, wilgotność, ciśnienie osmotyczne oraz relatywnie wysoka i stała temperatura, umożliwiając dynamiczniejszy metabolizm. Korzyści z tej interakcji dla gospodarza są mnogie: ochrona przed bakteriami patogennymi oraz pasożytami, pobudzanie odpowiedzi immunologicznej, warunkowanie prawidłowej szczelności bariery jelitowej, natomiast na pierwsze miejsce wysuwają się zwiększone możliwości trawienne. Progresywny i dynamiczny rozwój mózgu spowodował, że narząd ten jest najbardziej energochłonnym organem w całym ciele. W trakcie ewolucji, podczas silnego rozwoju mózgu jednoczesnej redukcji uległ inny kosztowny energetycznie układ – pokarmowy [4]. Mnogość gatunków bakterii zasiedlających jelito stała się sposobem na zwiększenie możliwości trawiennych i spektrum substancji możliwych do wychwytu. Przykładem są bakteryjne fitazy, enzymy rozkładające kwas fitowy w

nasionach, uwalniające jony Ca^{2+} , Mg^{2+} oraz związki fosforu będące w kompleksach z tym kwasem. Czyni to jony dostępnymi i użytecznymi dla gospodarza [7].

Innym przykładem substancji użytecznych, będących końcowym produktem fermentacji węglowodanów są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. SCFA - Short-chain fatty acids) [7,8]. SCFA powstają głównie z włókna pokarmowego oraz skrobi odpornej – składników, których człowiek nie jest w stanie strawić. Najistotniejszymi produktami tej przemiany jest octan, propionian oraz maślan w proporcjach odpowiednio 60:25:15. Kwasy te pełnią ważną funkcję w zwiększaniu przyswajalności pierwiastków, stanowią źródło energii oraz balansują pH w jelicie [4,8]. Maślan jako istotne źródło odżywcze dla enterocytów pomaga w utrzymaniu integralności ścian jelita, promuje stabilność genetyczną oraz jest czynnikiem immunomodulującym [7]. Poza tym kwas masłowy znany jest ze zdolności inhibicji deacetylazy histonowej (ang. HDAC - Histone deacetylases). Kwas octowy natomiast wpływa na dostępność substratu- koenzymu A, dla acetylotransferazy histonowej (ang. HAT - Histone acetyltransferases). Razem oba procesy skutkują promocją acetylacji histonów w neuronach, która może działać nieprawidłowo przy zaburzeniach lub braku flory jelitowej. Pokonywanie bariery krew-mózg przez SCFA w standardowych warunkach jest marginalne, natomiast długotrwała sekrecja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych wpływa na epigenetykę neuronów. Prowadzi to do wzmocnienia procesów pamięciowych, neurogenezy oraz działa ochronnie na komórki nerwowe. [4]

Metagenom

Według koncepcji metagenomu adaptacja makroorganizmów do środowiska

nie jest podyktowana jedynie zmiennością genów w obrębie genomu jądrowego, ale również genetyczną adaptacją symbiontów zamieszkujących dany makroorganizm. W ten sposób mikroorganizmy mogą być rozumiane jako część informacji genetycznej całej jednostki – holobiontu [4]. Symbionty zawierają 150 razy więcej genów niż genom ludzki [3]. Selekcja takich organizmów może być rozumiana jak „przedłużenie fenotypu”, czyli poszerzenie kodowanych cech gospodarza o cechy zagubione przez rdzenny genom. W ten też sposób mikroorganizmy przyczyniają się do zwielokrotnienia całkowitej informacji genetycznej kodowanej przez organizm gospodarza i wpływają na jego kondycję oraz możliwość adaptacji.

Bakterie mikrobioty mają zdolność do rozprzestrzeniania się na nowe habitaty i nowych gospodarzy. W odróżnieniu od rdzennego genomu przekazywanego jedynie transferem pionowym, ta część informacji mogłaby być rozpatrywana jako poziome przekazywanie informacji genetycznej między holobiontami. W organizmie holobiontu dochodzi do transferu genów na dwóch poziomach: mikrobiota-mikrobiota oraz mikrobiota-gospodarz. Ten dodatkowy system przechowywania informacji genetycznej ma swoje silne uzasadnienie w możliwości niezależnego reagowania mikroorganizmów na warunki środowiskowe, prowadząc do szeregu adaptacji. Bez organizmu nadzorującego „nagi” materiał genetyczny nie ma tej zdolności.

Oprócz zmienności wśród samych mikrobów warunkowanej przez selekcję oraz horyzontalny transfer genów istnieją również mechanizmy, które generują adaptację w zależności od gospodarza zmienności na poziomie struktury chromatyny tj. modyfikacji epigenetycznej. Niekodujące RNA jest alternatywnym sposobem nadzorującym organizm człowieka i jest zabezpiecze-

niem przed obniżoną regulacją np. w przypadku bakteryjnej dysbiozy. Epigenetyka jest mechanizmem regulującym geny, które ulegają transkrypcji oraz translacji lub tych, które pozostają na poziomie transkryptu. Modyfikowanie epigenetyczne umożliwia plastyczną odpowiedź na zmiany środowiska i determinuje polimorfizm. Mechanizmy epigenetyczne zależne od RNA są niezwykle istotne dla prawidłowej pracy układu nerwowego, funkcji poznawczych oraz pamięciowych. Edytowanie oraz metylacja RNA, zwłaszcza na poziomie mRNA, uległa znacznemu zwiększeniu w tkance nerwowej u ludzi, w porównaniu z innymi gatunkami.

Łącząc oba rodzaje mechanizmów nadzorujących: obecność mikroorganizmów jako żywej puli genetycznej zdolnej do adaptacji oraz wzmocnienie regulacji zależnej od niekodującego RNA, uzyskujemy poważnych kandydatów w wyjaśnianiu rozwoju ludzkiej inteligencji [4].

Wpływ mikrobioty na układ nerwowy

Pozornie dwa odrębne światy – mikrobiota oraz gospodarz mają zdolność do molekularnego dialogu. Nerw błędny jest kluczowy dla tej komunikacji i łączy jelita z mózgiem za pośrednictwem 100 milionów neuronów, tworząc w ten sposób jelitowy układ nerwowy (ang. ENS – Enteric nervous system) [9]. Układ enteryczny określany jest mianem „drugiego mózgu” i odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu jelit tj. motoryce i zdolnościach wydzielniczych [2]. Z drugiej strony ENS posiada receptory reagujące na obecność określonych bakterii lub produktów ich metabolizmów np. SCFA [9]. Komunikacja ta daje możliwość aktywacji nerwu X przez neurony ENS i kontakt z ośrodkowym układem nerwowym [2]. To poka-

zuje, że molekularny dialog ma charakter dwukierunkowy, działa na osi mikrobiota-gospodarz oraz gospodarz-mikrobiota [2,10].

Wolne, pozbawione mikroorganizmów postrzeganie neurobiologii uległo przeobrażeniu podczas badań nad florą bakteryjną człowieka, w szczególności związaną ze środowiskiem jelita [10]. Pozytywną korelację istniejącą między wielkością kory nowej mózgu a zachowaniami społecznymi opisuje hipoteza społecznego mózgu i jest kluczowa dla wyjaśnienia akceleracji ludzkiej inteligencji. Umysły gatunków żyjących w grupie są zdolne do współpracy w ramach osiągnięcia swoich celów. Wymagało to jednak przekształcenia pewnych obszarów mózgowia w trakcie ewolucji tj. części przedczołowej, oraz rozwoju systemu neuroendokrynnego. Współdziałanie w społeczności stworzyło potrzebę odczuwania przywiązania oraz empatii we wspólnocie bliskich. Silny rozwój układu endokrynnego wzmocnił potrzebę odczuwania emocji, w tym stresu. Prócz nadzoru ze strony ośrodkowego układu nerwowego potrzebował również kontroli ze strony alternatywnego systemu- mikrobioty [4].

Mimo, że wiele hipotez opartych jest na badaniach prowadzonych na gryzoniach, wstępne badania na ludziach zdają się potwierdzać bliską relację między mikrobiotą jelitową a funkcjonowaniem mózgu [10]. Kluczowa rola osi mikrobiota-ENS-mózg ukazuje częste współwystępowanie dolegliwości ze strony układu pokarmowego jak np. zespół jelita drażliwego oraz chorób zapalnych jelit, z zaburzeniami psychicznymi: depresją, stanami lękowymi czy sklerozą.

Zaburzenia szczelności bariery jelitowej doskonale obrazują silną korelację między mikrobiotą a dysfunkcjami psychicznymi. Istniejące zaburzenia na osi jelito-mózg często związane są z prze-

wlekłym bólem brzucha oraz zaburzeniami łaknienia. Istotność homeostazy jelit wynika z ogromnej powierzchni jaką osiągają, 400-600 m², a to z kolei stanowi największy obszar kontaktu organizmu ze środowiskiem zewnętrznym [3].

Przykładem choroby, w której przepuszczalność bariery jelitowej ulega znacznemu zwiększaniu jest choroba Parkinsona. Wieloukładowe dysfunkcje obejmują także układ pokarmowy oraz ENS, i co najistotniejsze- zmiany w obrębie układu enterycznego obserwuje się przed degradacją ośrodkowego układu nerwowego. Zwiększona przepuszczalność dla substancji ze światła jelita, w tym również dla lipopolisacharydu zwiększa odczyn zapalny i koreluje z uszkodzeniami w obrębie układu enterycznego [7]. W badaniu śluzówki oraz mikrobioty obecnej w kale pacjentów z chorobą Parkinsona zaobserwowano znaczące zmiany względem grupy kontrolnej. U zdrowych pacjentów wykryto znamienne większą liczbę domniemyanych przeciwzapalnych grup taksonomicznych, o zdolności do produkcji maślanu, z rodzajów *Blautia*, *Coproccoccus*, *Roseburia* w próbkach kału, oraz *Faecalibacterium* izolowany ze śluzówki. Natomiast ze śluzówki osób z chorobą Parkinsona izolowano więcej bakterii związanych z aktywnością prozapalną, głównie z rodzaju *Ralstonia*. W metagenomicznych badaniach wykazano, że duża część genów zaangażowanych w metabolizm uległa redukcji u badanych pacjentów z chorobą Parkinsona, natomiast geny biosyntezy LPS oraz zaangażowane w III system bakteryjnej sekrecji uległy zwiększeniu w porównaniu do grupy kontrolnej [11].

Encefalopatia wątrobowa (ang. HE – Hepatic encephalopathy) jest syndromem neuropsychicznym związanym ze zmianą flory jelitowej, szczególnie w obrębie śluzówki [2,12]. Sugeruje to, że

w patogenezie tej choroby kluczową rolę odgrywa dysfunkcja bariery jelitowej [12]. HE jest związane z akumulowaniem toksyn przez układ krwionośny, szczególnie amoniaku oraz aminokwasów aromatycznych [2,12]. Związki toksyczne, które nie są neutralizowane przez wątrobę, za pośrednictwem układu krwionośnego pokonują barierę krew-mózg, wywołując efekt endotoksemii [2].

U organizmów z dysbiozą bakteryjną funkcje socjalne oraz prawidłowy rozwój mózgu zostają zachwiane, a z drugiej strony trudno takie funkcje przywrócić, ponieważ brak organu nadzorującego – mikrobioty. Zmniejszenie funkcji socjalnych u ludzi z dysbiozą ogranicza możliwość transferu mikroorganizmów drogą transferu poziomego i może pogłębić stan, w którym obecnie się znajdują. Przykładem zaburzenia układu nerwowego, w którym obserwuje się zarówno zaburzenia w prawidłowej florze jelitowej oraz nieprawidłowości w epigenetycznych mechanizmach zależnych od niekodującego RNA jest autyzm. Te dysfunkcje sprawiają, że osoby autystyczne przejawiają problemy z zachowaniem socjalnym oraz wyrażaniem emocji [4].

Wpływ mikrobioty na układ immunologiczny

Według koncepcji psychoneuroimmunologii układ nerwowy jest kluczowym czynnikiem koordynującym układ odpornościowy zarówno na poziomie systemicznym, jak i lokalnym – śluzówki jelita [1]. Udowodniono, że interakcja typu mikrobiota-gospodarz jest konieczna do prawidłowego rozwoju układu immunologicznego [4]. Nadrzędna funkcja symbiontów jelitowych w kontroli jakościowej i ilościowej cytokin wynika z interakcji z GALT (ang. gut-associated lymphoid tissue), tkanką limfatyczną przewodu pokarmowego. Tu

powstaje 70-80% komórek odpornościowych [3].

Począwszy od życia płodowego dochodzi do jedności w dojrzewaniu układu nerwowego oraz immunologicznego. Oba te układy wraz z kolonizacją organizmu przez bakterie i rozwojem mikrobioty mają dynamiczny, progresywny i zależy od siebie charakter, który kształtuje się jeszcze miesiącami i latami po urodzeniu. Kolonizacja od pierwszych momentów życia przebiega bardzo gwałtownie i nie jest obojętna dla nowonarodzonego. Powoduje to kaskadę reakcji z indukacją wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, aktywacją receptorów TLR (ang. Toll-like receptor) oraz stresu wywołanego kolonizacją bakteryjną i ekspozycją na mikrobiologiczne metabolity. Jest to proces naturalny, który po pewnym czasie ulega normalizacji. Niepatogenne bakterie obecne w jelitach dorosłego człowieka mają zdolność stymulacji układu odpornościowego i powstania limfocytów Th1 oraz Treg, ale nie Th2. Limfocyty tych subkultur aktywują podgrupę neuronów serotonergicznych, które warunkują metabolizm serotoniny i dobre samopoczucie w okresie zdrowia, w odróżnieniu od patologicznych stanów i niekorzystnego działania na te neurony [5].

Takim patologicznym stanem jest stres, który może być definiowany jako jakiegokolwiek zaburzenie homeostazy organizmu. Stres jest czynnikiem, który przyczynia się do powstania zaburzeń układu pokarmowego, najczęściej o charakterze zapalnym. Gwałtowny stres charakteryzuje się zdolnością do leukocytozy, czyli podwyższenia całkowitej ilości białych krwinek. To przyczynia się do zmian procentowych w obrębie populacji limfocytów. Szczególnie liczne stają się limfocyty cytotoksyczne oraz limfocyty NK, a to przyczynia się do zwiększenia zdolności cytolitycznych i pogłębienia stanu zapalnego. Chronicz-

ny, trwałe stres powoduje przedłużone wysokie stężenie kortyzolu i działa redukująco na ilość wspomnianych wcześniej subpopulacji limfocytów. To przyczynia się do ogólnoustrojowej immunosupresji i w konsekwencji również powoduje utrzymujący się stale stan zapalny.

ENS w odpowiedzi na stres zwiększa bakteryjne możliwości adhezji do śluzówki oraz uwrażliwia śluzówkę na mediatory wydzielane przez komórki tuczne. To z kolei stymuluje limfocyty T do uwalniania prozapalnych cytokin IFN- γ oraz TNF- α , które przyczyniają się do inicjacji stanów zapalnych i wtórnie do obniżenia przepuszczalności błony jelit. W doświadczeniu na szczurach z deficytem komórek tucznych sprawdzano indukujący wpływ stresu na wzrost przepuszczalności jelit. Okazało się, że szczury z deficytem w produkcji komórek tucznych traciły jedynie na wadze, bez zmian w przepuszczalności śluzówki, w odróżnieniu od szczurów z kontroli [1]. W innym badaniu na gryzoniach o zwiększonej liczbie komórek tucznych, będących na diecie wysokotłuszczowej sprawdzano przeciwwapalny wpływ probiotycznych szczepów: *Lactobacillus rhamnosus* GG oraz *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS. Po terapii bakteriami uzyskano leczniczą redukcję w ilości komórek tucznych. Dodatkowo *Propionibacterium* sp. JS zmniejszył stężenie TNF- α , podczas gdy *L. rhamnosus* GG zwiększył stężenie przeciwwapalnej cytokiny IL-10 [13].

Terapia bakteriami

Już od dawna wiadomo, że probiotyki mają korzystne działanie na zdrowie człowieka. Jednak stosunkowo od niedawna zauważono, że pewne szczepy bakterii mają szczególnie pozytywny efekt na układ nerwowy człowieka. W ten sposób wyodrębniono specjalną klasę probiotyków o korzystnym efekcie

dla osób cierpiących na schorzenia psychiatryczne. Psychobiotyki to żywe organizmy o zdolności do produkcji i dostarczania makroorganizmowi substancji neuroaktywnych takich jak GABA (kwas γ -aminomasłowy) lub serotonina. Pożyteczny wpływ polega głównie na redukcji stanów zapalnych oraz na hamowaniu aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, która jest zaangażowana w rozwój depresji psychologicznej [14]. Istnieje dużo dowodów naukowych potwierdzających możliwość zmiany chemizmu mózgu przez florę jelitową i w konsekwencji możliwość modyfikacji zachowania. Coraz więcej dowodów naukowych łączy stany dysbiozy lub zachwiania mikrobioty z depresją, stanami lękowymi, problemami z pamięcią lub chronicznym stresem. To też stało się motorem napędowym do poszukiwania alternatywnych terapii w leczeniu dolegliwości psychicznych przy pomocy pożytecznych bakterii- psychobiotyków [15].

W teście wymuszonego pływania (ang. FST - Forced swim test) myszy, które zasiedlono dodatkowo szczepem *L. rhamnosus* JB-1, pływały dłużej niż myszy kontrolne. Wykazano, że szczep tych mikroorganizmów redukuje stres wywołany kortyzolem. Efekt oddziaływania na gospodarza znika kiedy nerw błędny zostaje zerwany, co sugeruje, że jest kluczowy w komunikacji mikrobiota-gospodarz [9]. W innym doświadczeniu FST u szczurów z użyciem *Bifidobacterium infantis* uzyskano podobne wyniki, tym razem prawdopodobnie przez redukcję stężenia prozapalnych cytokin IFN- γ , TNF- α oraz IL-6 [9].

Psychobiotyki mają duży potencjał by zredukować negatywne skutki psychicznych dolegliwości. 30-dniowa konsumpcja *Lactobacillus helveticus* oraz *Bifidobacterium longum* doprowadziła do obniżenia poziomu hormonu stresu - kortyzolu, i tym samym wpłynęła na po-

prawę zachowań depresyjnych i lękowych [2]. Długotrwałe podawanie szczepu *B. infantis* tłumi stres noworodków spowodowany pierwotną kolonizacją w pierwszych etapach życia oraz redukuje zachowania depresyjne u dorosłych [10]. Szczep *B. infantis* 35624 ma zdolność do zwiększania stężenia tryptofanu, prekursora serotoniny, oraz produkcji neurotransmiterów tj. GABA, aktywujących te same receptory co leki przeciwłękowe [9].

Inną cenną właściwością psychobiotyków jest zdolność do poprawy funkcji poznawczych i pamięciowych. Szczep probiotyczny *L. helveticus* ROO52 jest zdolny do redukcji zachowań lękowych oraz złagodzenia dysfunkcji pamięciowych. Terapia kombinowana polegająca na spożyciu *L. rhamnosus* oraz *L. helveticus* skutkowała złagodzeniem zaburzeń pamięciowych wywołanych przez infekcję *Citrobacter rodentium* u myszy. W innych badaniach udowodniono redukujący wpływ na zachowania lękowe oraz lepsze rezultaty w teście na przejście labiryntu u gryzoni zasiedlonych *Mycobacterium vaccae*. Przyczynił się do tego prawdopodobnie wzmożony proces neurogenezy oraz podwyższone stężenie serotoniny warunkowane przez tę bakterię [10].

Mikrobiologiczna kontrola

Nie ma wątpliwości, że flora jelitowa odgrywa bardzo ważną, pozytywną rolę w utrzymaniu homeostazy swojego gospodarza. Jest jednak również negatywna strona interakcji gospodarz-mikrobiota. Istnieje dużo doniesień naukowych, które łączą obecność osi mikrobiota-ENS-mózg z mikrobiologiczną kontrolą układu nerwowego. Mikroorganizmy mają zdolność manipulacji zachowaniami żywiciela, tak by zwiększyć swoją kondycję kosztem gospodarza, w którym bytują. Strategią uzyskania przez mi-

kroby swojego celu jest generowanie pragnienia na rodzaj jedzenia sprzyjający ich rozwojowi, działający inhibująco na ich konkurencję, lub wzbudzanie przyjemności przy spożywaniu określonego rodzaju pożywienia bądź powodowania bólu gdy tego jedzenia brak [9,10].

Mikrobiota jelitowa, w której obecne jest małe zróżnicowanie mikroorganizmów stanowi potencjalnie większe zagrożenie dla organizmu który zasiedla. Jednym ze sposobów uzyskania własnych profitów przez bakterie jest osiągnięcie quorum sensing, czyli ilości która umożliwia masową koordynację zachowań grupy mikroorganizmów. Po uzyskaniu quorum mikroorganizmy mają zdolność do ekspresji genów wirulencji np. odpowiedzialnych za produkcję toksyn oraz białek indukujących receptory bólu gospodarza, i w odpowiedzi na niskie stężenie ważnych substancji wzrostowych manipulacji zachowaniami żywieniowymi makroorganizmu. W pewnych badaniach sugerowano, że nieutulny płacz dziecka związany z kolką niemowlęcia może mieć swoją przyczynę w zmienionej mikrobiocie. Wykazano, że w porównaniu z kontrolą niemowlaki takie posiadały zmniejszoną różnorodność flory jelitowej połączoną ze zmniejszeniem *Bacteroidetes* kosztem wzrostu liczby *Proteobacteria*. Kolka rozpatrywana może być jako przyczyna płaczu, który ma na celu zwrócenie uwagi rodziców, to zaś z kolei przyczynia się do zwiększonego dostarczania substancji odżywczych i energii bakteriom [9].

Kolejnym sposobem na bakteryjną manipulację jest zdolność do produkcji neuroaktywnych transmiterów lub ich prekursorów: GABA, tryptofan, serotonina, histamina, noradrenalina oraz dopamina [4]. Produkty mikrobiologicznego pochodzenia pobierane są z przewodu pokarmowego i ra-

zem z krwią mogą wędrować do różnych tkanek gospodarza [7]. Jelita są bardzo bogatym źródłem dopaminy dla ludzkiego ciała i produkcja całkowitej ilości tego hormonu sięga nawet 50%. Zdolność do produkcji dopaminy ma wiele potencjalnie chorobotwórczych bakterii jak: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* czy *Staphylococcus aureus*. W doświadczeniu na myszach wykazano, że dopamina i noradrenalina zwiększają zdolność adherencji *E. coli* O157 do śluzówki kątnicy. Noradrenalina dodatkowo promowała internalizację *Salmonella choleraesuis* oraz *E. coli* O157. Makroorganizm nie jest bierny wobec bakteryjnej manipulacji i w procesie koevolucji wykształcił szereg mechanizmów obronnych. Kontrola mikrobioty i zasiedlanie przez różnorodne mikroorganizmy nie dopuszcza do osiągnięcia przez dany gatunek bakterii quorum sensing i ogranicza ekspresję czynników wirulencji. Ssaki, w tym również człowiek mają zdolność do produkcji przeciwciał wychwytyjących hormony obcego pochodzenia, jednak z powodu dużego podobieństwa strukturalnego istnieje zagrożenie wytworzenia auto-przeciwciał przeciw własnym hormonom. Z tego też powodu istnieje dodatkowy system ochronny polegający

na degradowaniu neurotransmiterów pochodzenia bakteryjnego przez oksydazę monoaminową, która wycisza substancje egzogenne [9].

Podsumowanie

Mnogość badań dotyczących mikroorganizmów pokazuje jak złożone interakcje występują na osi mikrobiom-gospodarz. Rozpatrywanie ludzi jako niepodległych, odrębnych jednostek jest niemożliwe, ponieważ żyją w świecie bakterii. Nie powinno więc zaskakiwać, że flora symbiotyczna człowieka odgrywa kluczową rolę w zdrowiu i okresie choroby. Stany dysbiozy bakteryjnej coraz częściej łączone są przez naukowców z depresją, obniżoną percepcją oraz stanami lękowymi. Zachwianie prawidłowej mikrobioty jelitowej warunkuje również szereg innych jednostek chorobowych takich jak: alergie, zwiększona podatność na organizmy patogenne, przewlekłe stany zapalne, zaburzenia hormonalne czy problemy z trawieniem. Właściwa diagnoza choroby połączona z odpowiednio dobranymi bakteriami probiotycznymi może już wkrótce okazać się podstawową formą leczenia. Dzięki temu terapia osób chorych będzie skuteczniejsza, a czas rekonwalescencji zredukowany.

Bibliografia

- [1] Mawdsley J.E., Rampton D.S., Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications, *Gut*, 2005, 54(10), 1481-91
- [2] Zhou L., Foster J.A., Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2015, 11, 715-23
- [3] Rudzki L., Szulc A., Wpływ jelitowej flory bakteryjnej na ośrodkowy układ nerwowy i jej potencjalne znaczenie w leczeniu zaburzeń psychicznych, *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*, 2013, 2, 69-77
- [4] Stilling R.M., Bordenstein S.R., Dinan T.G., Cryan J.F., Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and

- development?, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4, 147
- [5] El Aidy S., Dinan T.G., Cryan J.F., Immune modulation of the brain-gut-microbe axis, *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 146
- [6] Wopereis H., Oozeer R., Knipping K., Knol J., The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis, *Pediatr Allergy Immunol*, 2014, 25(5), 428-38
- [7] Conlon M.A., Bird A.R., The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health, *Nutrients*, 2015, 7(1), 17-44
- [8] Kuczyńska B., Wasilewska A., Biczysko M., Banasiewicz T., Drews M., Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe - mechanizmy działania, potencjalne zastosowania kliniczne oraz zalecenia dietetyczne,

Nowiny Lekarskie, 2011, 80(4), 299-304

[9] Alcock J., Maley C.C., Aktipis C.A., Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms, *Bioessays*, 2014, 36, 940-9

[10] Mayer E.A., Knight R., Mazmanian S.K., Cryan J.F., Tillisch K., Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience, *The Journal of Neuroscience*, 2014, 34(46), 15490-6

[11] Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A., Voigt R.M., Naqib A., Forsyth C.B., Mutlu E., Shannon K.M., Colonic bacterial composition in Parkinson's disease, *Mov Disord*, 2015

[12] Rai R., Saraswat V.A., Dhiman R.K., Gut Microbiota: Its Role in Hepatic Encephalopathy, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*,

2014, 5(1), 29-36

[13] Kirjavainen P.V., EINEZAMI H.S., Salminen S.J., Ahokas J.T., Wright P.F.A., Effects of Orally Administered Viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium*

freudenreichii subsp. *shermanii* JS on Mouse Lymphocyte Proliferation, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, 6(6), 799-802

[14] Dinan T.G., Stanton C., Cryan J.F., Psychobiotics: a novel class of psychotropic, *Biol Psychiatry*, 2013, 74(10), 720-6

[15] Dinan T.G., Cryan J.F., Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?, *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(9), 713-9

Białka MDM2, MDMX i p53 oraz znaczenie ich interakcji w nowotworzeniu i terapii przeciwnowotworowej

Katarzyna Sitarz

Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mygen”

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemii

Uniwersytet Jagielloński

k.sitarz@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dra Łukasza Skalniaka

Białko MDM2 (z ang. mouse double minute 2 homolog) jest ważnym negatywnym regulatorem supresora nowotworowego, jakim jest białko p53. Regulacja białka p53 przez MDM2 zachodzi na dwa sposoby: poprzez zmniejszanie aktywności białka p53 lub zmniejszanie jego stabilności. Badania prowadzone na 28 typach nowotworów wykazały zwiększoną ekspresję tego regulatora w 7% z nich. Wysoka ekspresja białka najczęściej jest spowodowana amplifikacją genu, ale mogą ją powodować także inne mechanizmy, takie jak polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP309) w rejonie promotora, a także mutacje powodujące zwiększoną transkrypcję lub translację. Nadekspresja MDM2 w nowotworach jest skorelowana ze złym rokowaniem klinicznym, a obecne metody terapii nie są w takim przypadku skuteczne.

Jedną z dróg w tworzeniu nowoczesnych terapii nowotworów jest projektowanie drobnocząsteczkowych antagonistów białka MDM2, służących blokowaniu interakcji pomiędzy białkami MDM2 oraz p53. Kilka związków tego typu, otrzymanych w ostatnich latach, poddawana jest obecnie testom klinicznym, w celu weryfikacji ich potencjału terapeutycznego.

Wstęp

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa ważną rolę w supresji nowotworów. W prawidłowej, zdrowej komórce tworzy ono kompleks z białkiem MDM2, które hamuje jego aktywność i kieruje je do degradacji w proteasomie [1]. Gdy komórka zostanie narażona na szkodliwe czynniki sprzyjające uszkodzeniom DNA (m.in. promieniowanie rentgenowskie), dochodzi do fosforylacji białka p53, czego konsekwencją jest rozłączenie kompleksu z MDM2 i stabilizacja białka. Aktywowane w ten sposób białko p53 in-

dukuje transkrypcję szeregu genów, w tym genu kodującego białko p21. Białko to wiąże się z kompleksem cyklina-Cdk powodując jego inaktywację, co prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego, dając w ten sposób komórce czas na usunięcie ewentualnych uszkodzeń DNA. W przypadku braku możliwości naprawy uszkodzeń, białko p53 bierze udział w aktywacji apoptozy, chroniąc w ten sposób organizm przed ryzykiem indukcji procesów nowotworzenia.

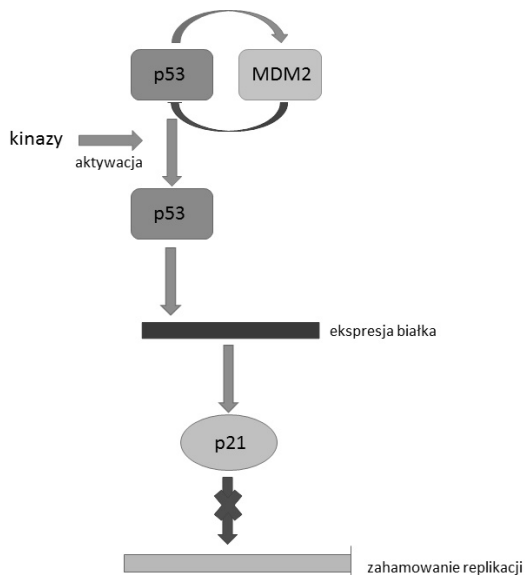


Fig. 1. Uproszczony schemat współdziałania białek p53 i MDM2 w hamowaniu replikacji DNA



Fig. 2. Struktura przestrzenna białka p53 (PDB: 2J0Z)

Białko p53: informacje podstawowe

Zostało odkryte w 1979 roku [2] w wyniku prowadzenia badań nad indukcją nowotworów za pomocą czynników chemicznych. Ludzkie białko p53 budują 393 aminokwasy, a jego przewidywana masa cząsteczkowa jest równa około 43,7 kDa,

jednak, z powodu składu aminokwasowego, w elektroforezie daje prążek o szacunkowej masie 53 kDa i to właśnie od tego pochodzi nazwa „p53” [3]. Gen kodujący białko (gen TP53) leży na chromosomie 17 (17p13) [4].

Mutacje w genie TP53

Somatyczne mutacje w genie TP53 są jednymi z najczęstszych zmian w ludzkich nowotworach. Stanowią one przyczynę występowania syndromu Li-Fraumeni, który predysponuje do wczesnego wystąpienia szerokiego spektrum nowotworów [5]. Większość mutacji spowodowana jest podstawieniem pojedynczej zasady w całej sekwencji kodującej białko. Zarówno rodzaj mutacji, jak i miejsce, którego ona dotyczy, mogą być cenną informacją odnośnie mutagenu, który ją wywołał [5]. Mutacje TP53 są również potencjalnymi markerami prognostycznymi i predykcyjnymi, oraz celami dla interwencji farmakologicznej [5]. Występują one w przypadku prawie wszystkich rodzajów nowotworów z częstotliwością od około 5% przypadków w białaczce szpikowej, mięsaku, raku jąder, czerniaku złośliwym i raku szyjki macicy, do 38-50% przypadków w raku jajnika, jelita grubego, przełyku, głowy i szyi, gardła i płuc [5].

Według dostępnych danych, 86% mutacji skupia się pomiędzy kodonami 125 i 300, co odpowiada umiejscowieniu domeny białka wiążącej DNA [5]. Większość mutacji w tym regionie polega na zmianie sensu (87,9%) [5]. Co ciekawe, poza tym regionem, mutacje typu zmiany sensu stanowią tylko około 40% mutacji, większość to przedwczesny kodon STOP lub zmiana ramki odczytu [5].

Syndrom Li-Fraumeni

Zespół Li-Fraumeni został opisany w 1969 roku na skutek retrospektywnej analizy przypadków ponad 600 dzieci chorych na mięsaka [6]. Jest to choroba dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. W większości przypadków, rodzice oraz inni członkowie rodziny chorego także zapadają na nowotwory charakterystyczne dla tego zespołu [7]. Zespół Li-Fraumeni powoduje mutacje w genach CHEK2 i TP53 [7]. Ponad połowa osób dotkniętych chorobą posiada mutację w genie TP53 [7].

Zespół Li-Fraumeni powoduje predyspozycje m.in. do: mięsaka tkanki miękkiej, kostniakomięsaka, przedmenopauzalnego raka piersi, guzów mózgu, raka kory nadnerczy (ACC) oraz białaczki. Nowotwory często występują już w dzieciństwie lub wczesnej dorosłości [8].

Białko p53 w apoptozie i autofagii

W odpowiedzi na sygnały spowodowane silnym stresem, p53 jest w stanie zainicjować procesy kierujące komórkę na drogę apoptozy lub starzenia komórkowego [2]. Tak zaindukowana apoptoza związana jest z zależną od p53 transkrypcją genów, kodujących białka-składniki zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych szlaków śmierci, m.in. BAX, FAS, NOXA i PUMA [2]. Natomiast starzenie komórkowe indukowane jest poprzez aktywację transkrypcji genów p21, PAI1 i PML [15]. W warunkach niższego stresu, gdy naprawa DNA jest możliwa, p53 promuje tymczasowe wstrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA [15].

Oprócz roli czynnika transkrypcyjnego p53 pełni też dodatkowe funkcje, czego dowodem jest obserwacja, że białko to może promować apoptozę w obecności inhibitorów transkrypcji [9]. p53 odgrywa rolę w

różnych procesach jądrowych, takich jak regulowanie homologicznej rekombinacji i przetwarzanie mikroRNA, jak również w kilku procesach cytoplazmatycznych [2]. p53 może również bezpośrednio wzmacniać MOMP (permabilizację zewnętrzną błony mitochondrialnej) i tym samym wywołać apoptozę [2]. Dzieje się tak dlatego, że białko p53 moduluje regulatory apoptozy z rodziny Bcl-2 [2].

p53 pełni również rolę w regulacji autofagii [2]. Proces ten pozwala na ponowne użycie makrocząsteczek będących produktami katabolizmu komórki - jest to strategia przeżycia w warunkach stresu oraz droga do usuwania szkodliwych, uszkodzonych struktur [10]. Autofagia może prowadzić do śmierci komórek i jest związana z tłumieniem rozwoju nowotworu [10].

Białka MDM2 i MDMX

Białka MDM2 i MDMX wiążą p53 i tym samym dezaktywują je. Dodatkowo białko MDM2 jest w stanie skierować p53 na drogę proteasomalnej degradacji. W związku z tymi aktywnościami białek MDM, amplifikacja genów MDM lub zmieniona ekspresja kodowanych przez nie białek jest cechą charakterystyczną wielu nowotworów.

MDM2 jest białkiem zbudowanym z 491 aminokwasów, a jego masa molekularna wynosi około 56 kDa [12]. Białko to zawiera wiele konserwowanych domen strukturalnych, w tym domenę N-kończową, wchodzącą w interakcje z p53, której struktura została rozwiązana za pomocą krystalografii rentgenowskiej [12]. Zawiera również domenę o aktywności ligazy ubikwitynowej E3, która pełni kluczową rolę dla aktywności białka.

Białko MDMX (znane również jako MDM4)



Fig. 3. Struktura przestrzenna białka MDM2 (PDB: 1Z1M)

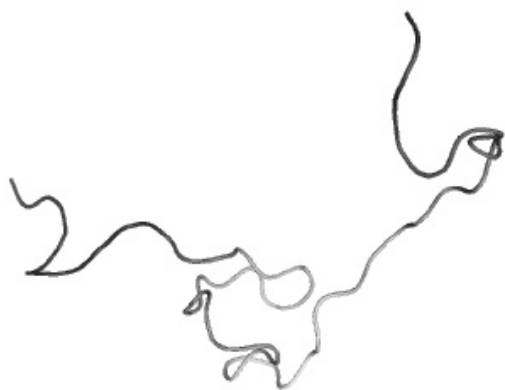


Fig. 4. Struktura przestrzenna białka MDMX (PDB: 2CR8)

charakteryzuje się długością 490 aminokwasów i w swojej strukturze posiada domenę RING [13]. Jego mRNA ulega ekspresji na wyjątkowo wysokim poziomie w grasicy. Białko MDM4 także wchodzi w interakcje z białkiem p53 dzięki swojej domenie N-końcowej [13]. MDM4 wykazuje znaczące podobieństwo strukturalne do białka MDM2 [13].

Podobieństwa i różnice pomiędzy MDM2 a MDMX

Oba białka mają zdolność hamowania aktywności białka p53 za pomocą hydrofobowego końca N. Jednak różnice w ich

budowie wpływają zarówno na zdolność regulacji aktywności p53, jak i na jego funkcje biochemiczne [11]. Jedną z różnic jest fakt, że chociaż obecność elementów reagujących na p53 stwierdzono w promotorach obu genów, to promotor genu MDM2 jest szerzej reagujący na aktywację p53 niż promotor genu MDMX [11]. MDM2 wiążąc i ubikwitynując p53 prowadzi do jego degradacji proteasomalnej, dzięki temu utrzymywany jest stały, niski poziom białka p53 w komórkach. Natomiast MDMX nie ma wewnętrznej aktywności ligazy ubikwityny, chociaż może zwiększać lub zmniejszać aktywność ligazy ubikwityny MDM2 w zależności od liczby cząsteczek białka MDMX [11].

Oligomeryzacja MDM2 i MDMX poprzez ich domeny RING ma zasadnicze znaczenie dla tłumienia aktywności p53 podczas rozwoju embrionalnego [11]. Ponadto, reszty aromatyczne, które są obecne w pozycji C-końcowej domeny pierścieniowej zarówno MDM2 jak i MDMX, są wymagane do rekrutacji ubikwityny E3[11]. Tak więc oligomeryzacja MDM2 i MDMX może powodować powstanie bardziej skutecznego kompleksu ligazy ubikwityny E3 białka p53, lub bardziej skutecznego inhibitora p53 zależnego od transaktywacji [11].

Drobnocząsteczkowe inhibitory oddziaływań białka p53 z białkiem MDM2

Duże nadzieje dotyczące terapii chorób nowotworowych pokłada się w drobnocząsteczkowych antagonistach białka MDM2. Obecnie siedem takich związków jest w fazie badań klinicznych. W niniejszym artykule zostaną pokrótce opisane 4 z nich.

1. RG7112. Pierwszy inhibitor MDM2 włączony do fazy I badań klinicznych [16]. Został on przetestowany w trakcie badań klinicznych pod kątem wielu nowotworów,

m.in. białaczki szpikowej, mięsaka i nowotworów hematologicznych [16]. Terapia dawała pozytywne rezultaty [16]. Stwierdzono aktywację białka p53, wzrost poziomu białka p21 i indukcję apoptozy [16]. Do skutków ubocznych leku zaliczono m.in. neutropenię i trombocytopenię [16].

2. RG7388. Wiąże się z MDM2 z wysokim powinowactwem, ale ma słabą biodostępność przy podaniu doustnym, jednak badania wykazują, iż dodanie reszt fluoru do określonych grup cząsteczki ją poprawia [16]. Wykazuje wysoką selektywność względem komórek nowotworowych posiadających ekspresję białka p53 (100x) [16]. Badania kliniczne wykazały ponadto, że RG7388 z niższą częstotliwością niż RG7112 powoduje skutki uboczne [16].

3. MI-77301. Budowa oparta na strukturach naśladujących trzy kluczowe reszty wiążące p53 (Phe19, Trp23 i Leu26). Wadą jest słabe powinowactwo względem białka

MDM2 [16]. Podobnie jak RG7388 wykazuje wysoką (ok. 100x) selektywność [16].

4. AMG 232. Jest to związek zawierający piperydynę [16]. Również naśladuje on 3 kluczowe dla wiązania z MDM2 reszty p53 [16]. Na podstawie badań na myszach wykazano, że zazwyczaj powoduje on regresję guza (10 na 12 przypadków) [16].

Podsumowanie

Mutacje powodujące silne oddziaływanie białek p53 i MDM2 są jednymi z najczęściej spotykanych w nowotworach. Drobnocząsteczkowe inhibitory tych oddziaływań są nadzieją na opracowanie skutecznej terapii nowotworów, wykazujących ekspresję prawidłowego białka p53. Jeśli dalsze etapy badań klinicznych tych cząsteczek przebiegną pomyślnie, być może powstanie nowa generacja leków przeciwnowotworowych.

Bibliografia:

[1] Podstawy biologii komórki, red. B. Alberts, Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2009
[2] Brady CA et.al., p53 at a glance, *Journal of Cell Science*, 2010, 123, 2527-32
[3] DeLeo AB et.al., Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76, 2420-4
[4] <http://omim.org/entry/191170>
[5] Olivier M et.al., TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010, 2, 1-17
[6] Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 66(2), 83-92
[7] <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/li-fraumeni-syndrome>
[8] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>
[9] Caelles C et.al., p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes., *Nature*, 1994, 370(6486), 220-3
[10] Tasdemir E et.al., p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion., *Cell cycle*, 2008, 7(19), 3006-11

[11] Wade M et.al., MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy, *Nature Reviews*, 2013, 13, 83-96
[12] Uhrinova S et.al., Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding, *Journal of Molecular Biology*, 2005, 350(3), 587-98
[13] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4194>
[14] Murray-Žmijewski F et.al., A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress., *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2008, 9(9), 702-12
[15] Zilfou JT et.al., Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2009, 1(5), 1-12
[16] Zhao Y et.al., Small-Molecule Inhibitors of the MDM2/p53 Protein-Protein Interaction (MDM2 Inhibitors) in Clinical Trials for Cancer Treatment, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58, 1038-52

Roślinne dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych

Julia Sławianowska

Katedra Fizjologii Roślin i Genetyki

Wydział Przyrodniczy

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

julia.slawianowska@wp.pl

Praca napisana pod opieką dr Huberta Sytykiewicza

Aminokwasy aromatyczne w roślinach, oprócz swej funkcji strukturalnej, służą jako prekursorzy do biosyntezy pierwotnych i wtórnych metabolitów, związków zaangażowanych w kluczowe interakcje ze środowiskiem. Roślinne dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych to enzymy katalizujące zależną od fosforanu pirydoksalu dekarboksylację albo dekarboksylację - deaminację. Pomimo istotnych różnic aktywności katalitycznych oba typy dekarboksylaz są niezwykle trudne do rozróżnienia, gdyż cechuje je duże podobieństwo sekwencji aminokwasowych.

Tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina mogą być przekształcane przy pomocy dekarboksylaz do odpowiednich amin aromatycznych: tryptaminy, tyraminy i 2-fenyloetyloaminy. Tryptamina jest ważnym prekursorem alkaloidów indolowych i prostych alkaloidów β -karbolinowych, bierze też udział w biosyntezie IAA oraz monoaminy serotoniny.

Tyramina jest prekursorem syntezy alkaloidów benzyloizochinolinowych. Odkładana w ścianie komórkowej zwiększa jej wytrzymałość, pełniąc rolę ochronną przeciw patogenom. Obecnie prowadzonych jest wiele badań genetycznych nad dekarboksylazami tryptofanu i tyrozyny, ze względu na ich znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego, jak również możliwość zwiększenia odporności gatunków uprawnych na pasożyty.

Proces dekarboksylacji fenyloalaniny jest mniej znany, chociaż tak jak w przypadku tryptofanu i tyrozyny potwierdzono tu indukcję poprzez szlak zależny od jasmonianów, aktywny w reakcji roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Głównym jego produktem jest 2-fenyloetyloamina, występująca stosunkowo rzadko w roślinach wyższych. 2-Fenyloetyloamina (PEA) w tkankach roślinnych może być przekształcana w takie metabolity jak kwas fenylooctowy (PAA), aldehyd fenylooctowy (PAAlD), oraz 2-fenyloetanol (PE).

U pomidora wyizolowano geny odpowiedzialne za konwersję fenyloalaniny do PEA, a następnie PAAlD i PE - związków pełniących rolę w przywabianiu owadów zapylających i odstraszaniu żerujących. Natomiast u róży, petunii i rzodkiewnika funkcjonuje w tym szlaku bifunkcyjny enzym o aktywności zarówno dekarboksylazy, jak i aminooksydazy, przekształcający fenyloalaninę bezpośrednio do aldehydu fenylooctowego.

W niniejszej pracy przeglądowej omówione zostaną budowa, regulacja, metaboliczne i fizjologiczne role dekarboksylaz w roślinach, a także ich zastosowanie w inżynierii genetycznej.

Wstęp

Dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych (AAAD) to zaawansowane ewolucyjnie enzymy katalizujące zależną od fosforanu pirydoksalu dekarboksylację aminokwasów aromatycznych, występujące u roślin, ssaków i owadów.

Chociaż roślinne i zwierzęce AAAD cechuje rozległa homologia, istnieją między nimi ogromne różnice co do specyficzności substratowej. Roślinne dekarboksylazy tyrozyny (TyDC) i tryptofanu (TDC) wykazują specyficzność jedynie wobec aminokwasów o bocznym łańcuchu fenolowym (TyDC, aktywna wobec tyrozyny i dihydroksyfenyloalaniny -DOPY) lub indolowym (TDC aktywna jedynie wobec tryptofanu), jednak nigdy wobec obu naraz. W toku ewolucji u roślin doszło do powstania wielu paralogów AAAD o różnych funkcjach. Np. tyramina pochodząca od tyrozyny to prekursor syntezy wielu roślinnych metabolitów wtórnych: (amidy kwasu hydroksycynamonowego, alkaloidy benzyloizochinolinowe), zaś powstająca z tryptofanu tryptamina to prekursor syntezy alkaloidów indolowych. Roślinne dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych katalizują dekarboksylację albo dekarboksylację - deaminację.

Te dwie różne aktywności enzymatyczne prowadzą do powstania:

1) amin aryłowo-alkilowych i CO_2 , 2) aldehydów aromatycznych, CO_2 , NH_4 ,

H_2O_2 . (Ryc. 1)

Pomimo istotnych różnic aktywności katalitycznych oba typy dekarboksylaz są niezwykle trudne do rozróżnienia, ponieważ roślinne syntazy aromatycznych aldehydów (AAS) cechuje ogromne podobieństwo sekwencji do AAAD.

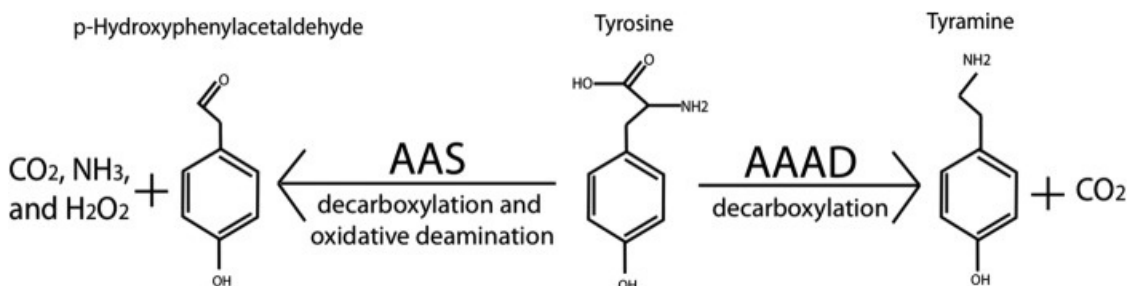
Analiza krystalograficzna pozwoliła na identyfikację reszt aminokwasowych odpowiadających za każdą z tych funkcji: reszta tyrozyny w pętli katalitycznej enzymu odpowiada za typową reakcję dekarboksylacji, zaś fenyloalanina w tej samej pozycji decyduje o aktywności syntazy aldehydowej.

AAS pełnią w roślinach dodatkowe, znaczące role fizjologiczne, np. biorą udział w produkcji związków lotnych będących składnikami zapachu kwiatów i pełniących rolę atraktantów.[1], [2]

Dekarboksylacja a dekarboksylacja-deaminacja

Niektóre roślinne dekarboksylazy, oprócz typowej reakcji konwertującej aminokwasu do odpowiednich amin, mogą też przeprowadzać szczególnie rodzaj dekarboksylacji połączonej z oksydacyjną deaminacją, w efekcie której powstają aromatyczne aldehydy.

Pomimo wspomnianych różnic katalitycznych, oba typy dekarboksylaz są nie do odróżnienia przed etapem ekspresji białka, co w przeszłości prowadziło do błędnego spo-



Ryc. 1. Porównanie aktywności enzymatycznych AAAD i AAS

sobu klasyfikacji – i tak wszystkie poznane obecnie AAS początkowo zaliczane były do TyDC.

Z uwagi na całkowicie odmienne role fizjologiczne obu typów dekarboksylaz, rozróżnienie ich jest szczególnie istotne. W celu identyfikacji reszt aminokwasowych odpowiadających za każdą z tych funkcji, Torrens-Spence i wsp (2013) użyli jako punktu odniesienia ludzkiej dekarboksylazy histydynowej, ze względu na silną homologię do roślinnych AAAD oraz konserwatywny charakter reszt w centrum aktywnym enzymu.

Porównanie tych reszt do ich homologów w scharakteryzowanych roślinnych sekwencjach AAAD i AAS pozwoliło zidentyfikować aminokwasy potencjalnie odpowiadające za zróżnicowanie aktywności. I tak reszta tyrozyny w pętli katalitycznej odpowiada za typową reakcję dekarboksylacji, fenyloalanina w tej samej pozycji odpowiada za aktywność syntazy aldehydowej.

Zamiana fenyloalaniny na tyrozinę u AAS z *Arabidopsis thaliana* L. (rzodkiewnik pospolity) i *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss (pietruszka zwyczajna) zmieniła aktywność tych enzymów z dekarboksylacyjno-deaminacyjnej na dekarboksylacyjną, a zamiana tyrozyny na fenyloalaninę u *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (katarantus różowy) i *Papaver somniferum* L. (mak lekarski) spowodowała zmianę aktywności tych AAAD z dekarboksylacyjnej na dekarboksylacyjno-deaminacyjną.

Tyrozyna i fenyloalanina w centrum katalitycznym enzymu pełnią rolę „podpisu” umożliwiającego rozróżnienie między dwiema aktywnościami.

W celu wyodrębnienia reszt aminokwasowych decydujących o zaliczeniu białka do AAAD czy AAS zsyntetyzowano enzym chi-

meryczny o N-końcu z TYDC pochodzącym z *Thalictrum flavum* L. (rutewka żółta) i C-końcu z AAS pochodzącym z *P. crispum*. Aktywność hybrydy była typowa dla AAS, tak więc decydująca okazała się rola reszt zlokalizowanych na C-końcu.

Wcześniejsza błędna klasyfikacja wielu roślinnych dekarboksylaz może wynikać z metody stosowanej wówczas powszechnie do oznaczania ich aktywności – poprzez wykrywanie wydzielanego CO₂, co samo w sobie nie pozwala na rozróżnienie między AAS a AAAD.

Drugą przyczyną może być też niestabilność czy wysoka reaktywność niektórych AAS, uniemożliwiająca wykrycie ich bez odpowiednio czulej metody, jak np. HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa). To może wyjaśniać, dlaczego AAS u roślin i owadów zostały odkryte stosunkowo niedawno, podczas gdy pozostałe AAAD poznano znacznie wcześniej. [3]

Metaboliczne i fizjologiczne funkcje roślinnych AAAD

Dekarboksylaza tryptofanu (TDC)

W wyniku dekarboksylacji tryptofanu powstaje tryptamina, będąca prekursorem alkaloidów indolowych, do których należy wiele związków znajdujących zastosowanie jako farmaceutyki (winblastyna, ajmalina, chinina, kamptotecyna). Roślinna TDC została po raz pierwszy wyizolowana z *C. roseus* [4], następnie wyizolowano też geny z innych gatunków (*Camptotheca acuminata* Decne, *Ophiorrhiza pumila* L, *Oryza sativa* L, *Capsicum annuum* L, *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baill). Dekarboksylaza tryptofanu (TDC) bierze też udział w biosyntezie monoaminy serotoniny (5-hydroksytryptaminy) i prostych alkaloidów β -karbolinowych, jest też zaangażowana w biosyntezę

IAA. Większość badań skupia się jednak na roli TDC w biosyntezie terpenoidów alkaloidów indolowych. Związki te powstają ze wspólnego prekursora stryktozydyny, w wyniku kondensacji tryptaminy (ścieżka indolowa) i sekologaniny (terpenoid), katalizowanej przez syntazę stryktozydyny (STR). U *C. roseus* regulacja ekspresji TDC i STR jest skoordynowana – oba geny miały najwyższy poziom ekspresji w korzeniach, natomiast znacznie niższy w liściach, łodygach i kwiatach – co odpowiada rozmieszczeniu alkaloidów indolowych w tych organach. W tkankach *C. roseus* TDC jest kodowana przez jeden gen, natomiast u *C. acuminata* są to dwa niezależnie regulowane geny: TDC1 uczestniczy w obronie chemicznej warunkowanej przez stadia rozwojowe, TDC2 odpowiada za mechanizmy obronne indukowane przez atak patogena. Transkrypty TDC1 u *C. acuminata* występowały głównie w łodygach, w mniejszych ilościach w liściach, owocach i nasionach, najmniej w korzeniach – co również odpowiada rozmieszczeniu kaptopotecyny – głównego alkaloidu u tego gatunku.

TDC należy do genów których ekspresja jest zależna od elicytorów – u *rauwolfii* zmijowej potwierdzono stymulację ekspresji TDC przez jasmonian metylu i UV, supresję pod wpływem kwasu salicylowego, brak było natomiast różnicującego wpływu ABA. [5]

Dekarboksylaza tyrozyny (TyDC)

Dekarboksylacja tyrozyny odgrywa rolę w biosyntezie wielu metabolitów wtórnych u roślin.

W wyniku dekarboksylacji tyrozyny przez dekarboksylazę tyrozynową (TyDC) powstaje tyramina, prekursor syntezy róż-

nych metabolitów wtórnych: jak fitoaleksyna hordeina u *Hordeum vulgare* L., werbakozyd u *Syringa vulgaris* L., a także wielu związków z grupy alkaloidów benzyloizochinolinowych (jak morfina, kodeina, papaweryna, kolchicina). Geny TyDC zidentyfikowano m. in. u gatunków takich jak rzodkiewnik, pietruszka, mak, ryż.

Tyramina w stanie wolnym i w postaci amidu kwasu hydroksycynamonowego odkładanego w ścianie komórkowej, zwiększa jej odporność na strawienie, pełniąc rolę ochronną przeciw patogenom. Ta druga rola tyraminy jako integralnego komponentu roślinnej obrony została potwierdzona przez wyizolowanie genów TYDC z gatunków takich jak jęczmień czy rzodkiewnik, nie wytwarzających alkaloidów benzyloizochinolinowych.

W roślinach tyramina jest też jedną z tzw. fenetylamin (jak dopamina, norepinefryna) wykazującą toksyczność wobec kultur kalusowych wielu gatunków. Wykazano, że toksyczność tyraminy wynika z jej utleniania przez oksydazę polifenolową, której aktywność jest indukowana przez auksyny. Toksyczność tyraminy w tkankach roślinnych może być zniesiona przez potraktowanie ich egzogennymi cytokinami.

Wydzielanie tyraminy do ściany komórkowej w postaci nierozpuszczalnych amidów jest sposobem na unikanie autotoksyczności. [6]

Wysoki poziom ekspresji TyDC i towarzyszącą mu akumulację tyraminy stwierdzono w kwiatach rzodkiewnika, tytoniu i petunii.

W przeciwieństwie do wielu znanych TyDC, aktywnych w reakcji na atak patogenu, u *A. thaliana* nie zaobserwowano zmian regulacji ekspresji tego genu przy infekcji różnymi patogenami grzybowymi (*Botrytis*

cinerea) czy bakteryjnymi (*Pseudomonas syringae*), co więcej nie wykryto też żadnych pochodzących od tyraminy amidów kwasu hydroksycynamonowego.[7]

Dekarboksylaza fenyloalaniny

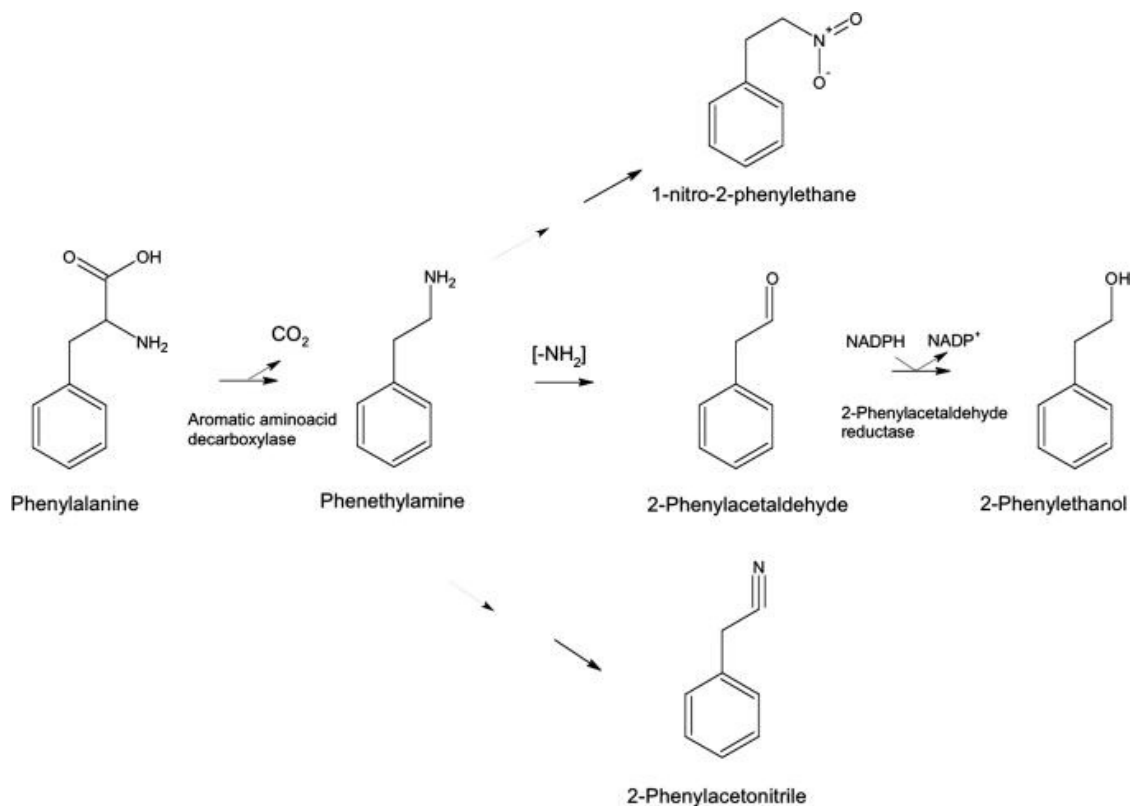
Procesem dekarboksylacji fenyloalaniny u roślin zaczęto się interesować od niedawna. Głównym produktem jest 2-fenyloetylamina, która następnie może być przekształcana w dalsze metabolity: aldehyd fenylooctowy (PAAld), kwas fenylooctowy (PAA) i 2-fenyloetanol (PE). PEA, tak jak pozostałe aromatyczne monoaminy, należy do substratów preferowanych przez aminooksydazy – enzymy generujące H₂O₂, wykorzystywany następnie w procesie wzmocnienia ściany komórkowej. Tak więc powstające podczas utleniania PEA reaktywne formy tlenu (ROS) to pierwszy etap aktywnej obrony przeciw patogenom. Generowane przez PEA ROS powodowały wzrost stężenia w cytozolu jonów Ca²⁺, pełniących rolę wtórnego przekąźnika sygnału. [8]

PAAld powstający w reakcji katalizowanej przez aminooksydazy, dalej może być utleniany do PAA przez oksydazę aldehydową bądź też redukowany do PE za pośrednictwem dehydrogenaz alkoholowych/reduktaz aldehydowych. Kwas fenylooctowy jest związkiem o aktywności auksynowej, występującym powszechnie wśród roślin. PAAld i PE to główne składniki zapachu kwiatów (petunia, róża). Przyczyniają się też do aromatu owoców pomidora, winogron, mandarynki, smaku herbaty. PAAld jest też, obok aldehydu salicylowego, jednym z głównych związków zapachowych produktów otrzymywanych z nasion gryki zwyczajnej. Fenyloetanol i aldehyd fenylooctowy to silne atraktanty dla owadów za-

pylających, fenyloetanol ma też właściwości przeciwbakteryjne. Synteza tych związków głównie w kwiatach i owocach wskazuje więc na ich ochronną rolę w procesie rozmnażania roślin.

Pierwsze badania nad genetycznym i molekularnym podłożem szlaku u roślin wyższych zostały wykonane przez Tiemana i wsp. [9], [10]. Wyodrębnione zostały u pomidora geny kodujące dekarboksylazę fenyloalaniny i reduktazę aldehydu fenylooctowego, potwierdzono również aktywność enzymów wobec odpowiednich substratów. Zidentyfikowano trzy geny kodujące enzymy katalizujące konwersję fenyloalaniny do fenyloetyloaminy i tyrozyny do tyraminy: LeAADC1A, LeAADC1B, LeAADC2. Tyrozyna jest preferowanym substratem *in vitro*, ale stężenie fenyloalaniny w owocach pomidora znacznie przewyższa stężenie tyrozyny, co wskazuje na rolę fenyloalaniny jako substratu fizjologicznego. Wszystkie trzy geny ulegają ekspresji w owocach, LeAADC1B i LeAADC2 są też dodatkowo ekspresjonowane w liściach.

PAAld może powstawać z fenyloalaniny na dwa sposoby: poprzez PEA (jeśli najpierw zachodzi dekarboksylacja, a później deaminacja), lub też kwas pirogronowy (jeśli najpierw tracona jest grupa aminowa, a później karboksylowa – ten drugi typ reakcji występuje powszechnie u drożdży. W celu sprawdzenia, która z tych ścieżek metabolicznych funkcjonuje u pomidora, Tieman i wsp. wykorzystali transgeniczną linię *Solanum pennellii* IL 8-2-1, zawierającą locus *malodorus*, związany z podwyższonym stężeniem aldehydu fenylooctowego, fenyloetanolu, 1-nitro-2-fenyloetanu i 2-fenyloacetonitrylu. Obecność azotu w łańcuchu bocznym 1-nitro-2-fenyloetanu i 2-fenyloacetonitrylu wskazuje



Ryc. 2. Szlak dekarboksylacji fenyloalaniny u *Solanum lycopersicum* L. i jej dalsza konwersja do lotnych metabolitów (Tieman i wsp. 2006)

że związki te są pochodnymi fenyloetyloaminy a nie fenylopirogonianu. (Ryc. 2)

W owocach winorośli również odkryto bardzo podobną dekarboksylazę (79% identyczności sekwencji z LeAADC), jak również potwierdzono obecność metabolitów: PEA, PAald, PE. [11]. Natomiast u melona przemiany aminokwasów prowadzące do biosyntezy aromatycznych związków lotnych zachodzą raczej poprzez transaminację niż dekarboksylację - ekspresja genów aminotransferaz CmArAT1 i CmBCAT2 była bardzo wysoka podczas dojrzewania owoców. [12]

Większość dekarboksylaz aminokwasów aromatycznych konwertuje substraty do odpowiednich amin. Jednak u petunii zidentyfikowano bifunkcyjny tetrameryczny enzym przekształcający

fenyloalaninę bezpośrednio do aldehydu fenylooctowego.

Kwiaty petunii akumulują duże ilości aldehydu fenylooctowego i mniejsze ilości fenyloetanolu. Tieman i wsp. (2007) wprowadzili gen reduktazy aldehydu fenylooctowego (LePAR) pochodzący z pomidora do petunii. Linie transgeniczne cechowały się wyższą zawartością fenyloetanolu, a niższą aldehydu fenylooctowego w porównaniu do typu dzikiego, co dowodzi działania enzymów LePAR *in vivo*. Odwrotnie niż u pomidora, aktywność reduktazy aldehydu fenylooctowego u petunii jest limitująca, prowadząc do jego dominacji nad fenyloetanołem w profilu zapachowym kwiatów. U róży też opisano istnienie podobnej bifunkcyjnej syntazy aldehydu fenylooctowego [13]

Poszukiwanie homologów PAAS w genomie *Arabidopsis thaliana* [7] pozwoliło na wykrycie genu At2g20340 o aktywności syntazy aldehydu octowego (AtAAS). W przeciwieństwie do tetrameru PAAS z petunii,AtAAS to homodimer. Enzym At2g20340 przekształca Phe do PHA i L-DOPE do dopaldehydu, brak natomiast aktywności wobec tryptofanu i tyrozyny. Oprócz aldehydów produktem reakcji był też NH_4 i CO_2 , nie dochodziło jednak do utworzenia H_2O_2 , inaczej niż u petunii.

Chociaż L-DOPA jest preferowanym substratem dla AtAAS *in vitro*, nie znaleziono jej u *A. thaliana*, nie stwierdzono też obecności alkaloidów benzyloizochinolinowych, dla syntezy których L-DOPA jest bezpośrednim prekursorem.

Funkcja AtAAS nie jest konserwatywna wśród różnych ekotypów *Arabidopsis thaliana*, jak też u różnych gatunków *Arabidopsis*. Przetestowano 3 ekotypy *Arabidopsis thaliana*: Col-0, Sei-0 i Di-G pod względem ekspresji AtAAS. Kwiaty Col-0 nie wytwarzały PHA w warunkach normalnych, jednak jest on głównym związkiem lotnym u ekotypów Sei-0 i Di-G, podobnie jak w kwiatach *Arabidopsis lyrata*, co wskazuje na znaczenie dla przywabiania owadów zapylających. W liściach Col-0 ekspresja At2g20340 była indukowana pod wpływem jasmonianu metylu i w odpowiedzi na zranienie, co sugeruje rolę PHA w obronnej reakcji rośliny.

Badania na kukurydzy również potwierdziły istnienie ścieżki dekarboksylacji fenyloalaniny, aktywowanej przez jasmoniany (Sytykiewicz i wsp. 2014, wyniki niepublikowane). Zaobserwowano duże zróżnicowanie poziomu ekspresji genów w zależności od stężenia elicytora, czasu ekspozycji i tkanki. Jak dotąd brak jest po-

dobnych doświadczeń genetycznych nad szlakiem dekarboksylazy fenyloalaniny u zbóż, dlatego potrzeba dalszych badań uwzględniających znaczenie innych czynników stresowych w regulacji ekspresji zaangażowanych w nim genów.

Znaczenie dekarboksylaz w inżynierii genetycznej

Obecnie prowadzonych jest wiele badań genetycznych nad roślinnymi TDC i TYDC, zwłaszcza na roślinach transgenicznym. Celem tych badań często jest otrzymanie roślin o podwyższonej zawartości alkaloidów mających duże znaczenie w medycynie i farmacji, bądź też synteza tych związków przez gatunki normalnie ich nie wytwarzające, zwiększenie odporności gatunków uprawnych na pasożyty, ale może nim być też zmiana danego szlaku biochemicznego skutkująca np. zmniejszeniem stężenia związków niepożądanych.

Catharanthus roseus (katarantus różowy) to endemiczny gatunek z Madagaskaru który stał się szczególnie istotny w badaniach molekularnych nad dekarboksylazą tryptofanową. TDC z *C. roseus* jest kluczowym enzymem dla biosyntezy alkaloidów indolowych takich jak winblastyna (związek wykorzystywany m. in w terapii niektórych nowotworów ze względu na zdolność hamowania mitozy) czy ajmalina (lek przeciw arytmii). Do alkaloidów indolowych należą też chinina (lek przeciwmalaryczny z drzewa chinowego) i strychnina (silnie toksyczna substancja pozyskiwana z kulczyby-wronie oko, stosowana od lat jako pestycyd).

U tytoniu z wprowadzonym genem TDC z *C. roseus* stwierdzono zwiększenie stężenia tryptaminy, wprost proporcjonalne do poziomu aktywności TDC, jak również prawie

zupełne zahamowanie rozwoju larw mączlika ostroskrzydłego. Produkcja tryptaminy w transgenicznym zbożu może być więc skuteczną metodą ochrony przed pasożytami, bez użycia toksycznych środków ochrony roślin. Introdukcja genu TDC do rzepaku spowodowała natomiast przekierowanie tryptofanu do syntezy tryptaminy zamiast glukozyzowanych indolowych, wpływających na znaczne pogorszenie walorów smakowych u zbóż oleistych. [2]

Jednakże wszelkie manipulacje genetyczne powinny uwzględniać złożoność mechanizmów regulacji ekspresji genów, jak również możliwe interakcje z innymi szlakami biochemicznymi – jest to szczególnie istotne w przypadku TDC czy TyDC, operujących na granicy między pierwotnym i wtórnym metabolizmem. Przykładem może być drastyczne zaburzenie szlaków szikimowego i biosyntezy fenylopropanoidów w bulwach ziemniaków z introdukowanym genem TDC. Przekierowanie tryptofanu do syntezy tryptaminy spowodowało spadek zawartości związków fenolowych gromadzonych w odpowiedzi na zranienie czy atak patogenu; w efekcie bulwy stały się bardziej podatne na infekcje. Tak więc AAAD mogą w roślinach transgenicznych zmienić dostępność innych substratów, nawet jeśli dany wprowadzony gen działa poza ich ścieżką biochemiczną. [5]

Transformacja różnych roślin heterologami TDC czy TyDC wykazała, że zakres aktywności introdukowanych genów zależy od gatunku – u tytoniu z wprowadzonym TDC poziom ekspresji jak i zawartość tryptaminy były kilkanaście-kilkadziesiąt razy wyższe niż u ziemniaka i rzepaku. U rzepaku transformowanego TyDC rośliny nie wykazywały ekspresji transgeny, w dodatku cechowały się obniżoną aktywnością

TyDC w porównaniu roślin do typu dzikiego.

Odrębną i istotną kwestią jest utrzymywanie się wprowadzonych zmian w kolejnych pokoleniach roślin. W doświadczeniu nad rzepakiem transformowanym TyDC z maku wszystkie pierwotne transformanty cechowały się obniżoną aktywnością własnego TyDC, nie wykryto natomiast w nich mRNA transgeny. W następnych pokoleniach wy-ciszenie transgeny zostało przezwyciężone, jednak dynamika ekspresji różniła się dla dwóch izoform TyDC. [2]

Badania genetyczne nad mechanizmem dekarboksylacji fenyloalaniny w roślinach to kwestia ostatniej dekady, więc w porównaniu do pozostałych AAAD wiedza ta jest wciąż niewielka.

Warto jednak wspomnieć o najnowszym osiągnięciu jakim jest opracowanie technologii pozyskiwania fenyloetanolu poprzez sklonowanie w *E. coli* PAAS z Rosa hybrid [14]. PE to główny składnik zapachu różanego, dlatego jest szeroko wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym, znajduje też zastosowanie jako konserwant i dodatek aromatyczny w przemyśle spożywczym. Obecnie większość światowej produkcji PE odbywa się przy użyciu metod wysoce toksycznych dla środowiska, stąd potrzeba alternatywnych technologii. Dotychczas jedyną alternatywą było pozyskiwanie PE z drożdży, naturalnie go wytwarzających. Ze względu na szybkość wzrostu oraz łatwość manipulacji genetycznych, bakterie mają zdecydowaną przewagę nad drożdżami – jednak do tej pory wykorzystanie *E. coli* do produkcji PE było niemożliwe, ponieważ nie funkcjonuje u nich szlak Ehrlicha, przekształcający fenyloalaninę do PE w trójetapowej reakcji. Rozwiązaniem okazało się wykorzystanie bifunkcyjnej PAAS

z róży, przeprowadzającej dwie pierwsze reakcje szlaku w jednej. Po sklonowaniu do *E. coli* na plazmidzie pTYB21, komórki syntetyzowały PE – jest to pierwszy szczep *E. coli* wytwarzający PE z fenyloalaniny bez konieczności dodawania zewnętrznego kofaktora PLP. Zastosowanie PAAS zamiast trójetapowego szlaku Ehrlicha może znacznie uprościć proces, redukując ilość wpływających na niego czynników i pozwalając na rozdzielenie fazy wzrostu komórek gospodarza od produkcji PE.

Podsumowanie

Roślinne dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych są enzymami operującymi na

Bibliografia:

- [1] Torrens-Spence M. P. et al., Biochemical evaluation of the decarboxylation and decarboxylation-deamination activities of plant aromatic amino acid decarboxylases, *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(4), 2376-2387
- [2] Facchini P. J. et al., Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications, *Phytochemistry*, 2000, 54, 121-138
- [3] Torrens-Spence M. P. et al., Biochemical evaluation of a parsley tyrosine decarboxylase results in a novel 4-hydroxyphenylacetaldehyde synthase enzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 418(2), 211-216
- [4] de Luca V. et al., Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal dopa decarboxylases, *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1989, 86, 2582-2586
- [5] Liu W. et al., Tryptophan decarboxylase plays an important role in ajmalicine biosynthesis in *Rauvolfia verticillata*, *Planta*, 2012, 236, 239-250
- [6] Kim Y. S. et al., Tyramine accumulation in rice cells caused a dwarf phenotype via reduced cell division, *Planta*, 2010, DOI 10.1007/s00425-010-1303-x
- [7] Gutensohn M. et al., Role of aromatic aldehyde synthase in wounding/herbivory response and flower scent production in different *Arabidopsis* ecotypes,

granicy między pierwotnym a wtórnym metabolizmem, a mechanizm ich regulacji jest wciąż słabo poznany. Dotychczasowe badania sugerują związek ich aktywności z chemiczną odpowiedzią rośliny na różne czynniki stresowe, zależną od jasmonianów. Jednak niewiele wiadomo o możliwych interakcjach z innymi szlakami biochemicznymi, kluczowymi w procesie wzrostu i rozwoju. Poznanie ich molekularnego podłoża i wyselekcjonowanie markerów genetycznych ma istotne znaczenie dla zrozumienia podstaw odporności roślin na stresy biotyczne i abiotyczne, a także możliwości uzyskiwania plonu o cechach pożądanych.

- The Plant Journal*, 2011, 66, 591-602
- [8] Kawano T. et al., Phenylethylamine-induced generation of reactive oxygen species and ascorbate free radicals in tobacco suspension culture: mechanism for oxidative burst mediating Ca²⁺ influx, *Plant Cell Physiol.* 2000, 41(11), 1259-1266
- [9] Tieman D. et al., Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde, *PNAS*, 2006, 103(21), 8287-8292
- [10] Tieman D. et al., Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol, *Phytochemistry*, 2007, 68, 2660-2669
- [11] Pan Q. H. et al., Molecular cloning and expression of gene encoding aromatic amino acid decarboxylase in 'Vidal blanc' grape berries, *Mol Biol Rep.*, 2012, 39, 4319-4325
- [12] Gonda I. et al., Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit, *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(4), 1111-1123
- [13] Kaminaga Y. et al., Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation, *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(33), 23357-23366
- [14] Achmon Y. et al., Cloning *Rosa* hybrid phenylacetaldehyde synthase for the production of 2-phenylethanol in a whole cell *Escherichia coli* system, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98, 3603-3611

Ciało prolamellarne - niezwykła struktura komórki roślinnej

Wiktor Jerzy Tokarek

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen”

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński, Kraków

wiktor.tokarek@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr hab. Beaty Myśliwej-Kurdzieli

W roślinach okrytonasiennych, rosnących w ciemności, biosynteza chlorofilu zostaje przerwana na etapie utworzenia protochlorofilidu, a proplastydy różnicują w etioplasty zamiast w chloroplasty. W etioplastach można wyróżnić wysoce uporządkowaną, parakrystaliczną strukturę, nazywaną ciałem prolamellarnym (PLB). Jest ona zbudowana z rozgałęzionych tubul, złożonych z białek i lipidów (głównie z mono- i digalaktozyloglicerolu). Główną funkcją PLB jest umożliwienie szybkiego wznowienia biosyntezy chlorofilu po oświetleniu. PLB zawiera kompleksy złożone z indukowanej światłem oksydoreduktazy protochlorofilid:NADPH, protochlorofilidu i NADPH, gotowych do przeprowadzenia reakcji redukcji protochlorofilidu w wyniku absorpcji światła. Oświetlenie etiolowanej tkanki roślinnej indukuje biosyntezę chlorofilu, powodując stopniową dezorganizację struktury PLB i proces formowania tylakoidów stromy i gran. Skutkiem tego jest przemiana etioplastów w chloroplasty. Niniejsza praca przedstawia aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji PLB oraz znaczenie tej struktury dla rozwoju chloroplastów roślin okrytonasiennych.

Wstęp

Rozwój roślin okrytonasiennych jest ściśle regulowany światłem. Chloroplasty, zawierające chlorofil wbudowany w złożone struktury aparatu fotosyntetycznego, umożliwiają roślinom prowadzenie autotroficznego trybu życia. Organella te są wynikiem różnicowania proplastydów. W ciemności proplastydy roślin okrytonasiennych różnicują w etioplasty (przegląd w [1]). Biosynteza chlorofilu w okrytonasiennych jest ściśle zależna od światła; w ciemności proces ten zostaje zahamowany na etapie biosyntezy protochlorofilidu (Pchlid) i jest kontynuowany tylko po oświetleniu rośliny[2]. Uproszczony sche-

mat biosyntezy Chlid w okrytonasiennych przedstawiono na Fig 1.

Pchlid jest cząsteczką porfirynową, składającą się z 4 pierścieni pirolowych i pierścienia izopentanowego [3]. Gdy tkanki rośliny okrytonasiennej nie mają dostępu do światła, Pchlid gromadzi się w etioplastach [4].

Reakcję redukcji Pchlidu przeprowadza enzym: indukowana światłem oksydoreduktaza protochlorofilid:NADPH (EC 1.3.1.13; LPOR) [5]. LPOR jest fotoenzymem, bezpośrednio wymagającym światła do przeprowadzenia reakcji katalitycznej [6]. Brak światła blokuje biosyntezę chlo-

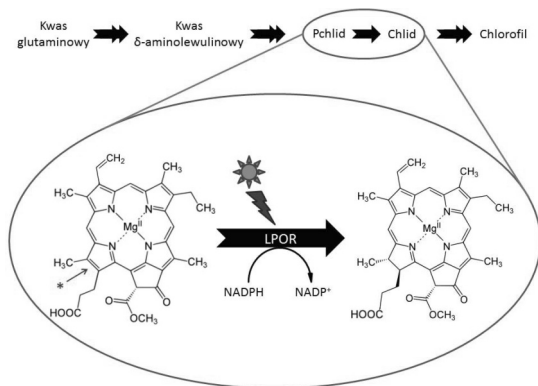


Fig. 1. Uproszczony schemat biosyntezy chlorofilu w okrytonasiennych. Szczegółowo przedstawiono etap redukcji protochlorofilidu do chlorofilidu. Zaznaczono wiązanie ulegające redukcji w cząsteczce Pchlidu (*). Podwójna strzałka na schemacie oznacza złożony ciąg reakcji.

rofilu, podstawowego barwnika fotosyntetycznego i uniemożliwia wytworzenie aparatu fotosyntetycznego.

Wewnątrz etioplastów wytwarza się unikalna struktura, nazywana ciałem prolamellarnym (ang. prolamellar body, PLB). Jest to wysoce uporządkowana, parakryształiczna struktura. Po raz pierwszy została opisana w roku 1954 na podstawie obrazów z mikroskopu fluorescencyjnego [7], i zanim zaadoptowano określenie „ciało prolamellarne” była określana, między innymi, jako gęste jądro (ang. dense core), pierwotne granum (ang. primary granum) lub centrum krystaliczne (ang. crystalline centre) [8].

Powstawanie PLB jest ściśle powiązane z gromadzeniem się kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH (nazywane „fotoaktywnym Pchlidem”) [1,9,10].

Występowanie PLB w naturze

Etiolowane siewki okrytonasiennych są dobrym modelem do badania PLB. Jednak niektórzy badacze twierdzą, że uprawianie roślin w ciemności przez długi czas nie odzwierciedla ich naturalnego rozwoju, a ba-

danie PLB może być pozbawione praktycznych aspektów (przegląd w [1]). Istnieją również sytuacje, w których rośliny rozwijają się w ciemności, a rozwój chloroplastów przechodzi przez etap etioplastów. Pierwszym przykładem może być kiełkowanie siewek pod ziemią, do których nie dociera światło słoneczne. Takie siewki są naturalnie etiolowane, a ich chloroplasty rozwijają się dopiero po przebicciu się na powierzchnię [11]. Kolejnym przykładem mogą być nadziemne części niektórych warzyw, np. głowa kapusty czy sałaty. Zawiera ona bardzo wiele warstw liści, co powoduje, że te położone najgłębiej są zacienione i także podlegają naturalnej etiolacji [12]. Podobny efekt można zaobserwować w przypadku zawiązków liściowych wewnątrz pąków [13]. Intensywność padającego światła jest znacznie obniżana przez liście (np. ponad stukrotnie w przypadku liści bluszczu) lub mętną wodę [14], co może promować powstawanie PLB w runie gęstych lasów lub w nieprzeźrzystych przybrzeżnych wodach. Przykłady te pokazują, że etiolacja, prowadząca do powstania PLB, może być uznana jako naturalny etap rozwoju tkanek roślin okrytonasiennych. Ponadto, zaobserwowano że w komórkach jęczmienia formowanie chloroplastów z etioplastów zachodzi szybciej niż z protoplastów [15].

Skład PLB

PLB złożone jest z lipidów i białek. Zawiera Pchlid, głównie w formie kompleksów z białkiem LPOR. Całkowite stężenie tego barwnika jest niewielkie [16], gdyż jego akumulacja spowalnia syntezę kwasu 6-aminolewulinowego, będącego prekursorem szlaku syntezy chlorofilu [3]. Strukturę Pchlidu przedstawiono na Fig. 1.

Funkcja białka	Nazwa białka
Biosynteza barwników	LPOR (izoforymy A i B) Syntaza chlorofilu
Reakcje świetlne fotosyntezy	Oksydaza protoporfirynogenu IX Podjednostki syntazy ATP CF1 α , β , ϵ , γ Plastocyjanina Cytochrom <i>b6</i>
Białka cyklu Calvina-Bensona	Mała i duża podjednostka karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanu Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu
Synteza białka	Podjednostki α i β polimerazy RNA
Białka opiekuńcze	FtsH

Tabela 1. Przykładowe białka zidentyfikowane w PLB pszenicy (za [18]).

Klasa lipidowa	Zawartość klasy (mol%)	Zawartość kwasów tłuszczowych (mol%)					
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
MGDG	52	2	-	-	-	4	93
DGDG	32	9	-	1	-	2	87
SQDG	8	37	-	4	1	4	54
PG	8	41	13	6	4	4	33

Tabela 2. Średnie zawartości poszczególnych klas lipidów oraz średni skład kwasów tłuszczowych danej klasy w błonach PLB wyizolowanych z pszenicy (za [19]). Oznaczenia: „-” – śladowa ilość, 16:0 – kwas palmitynowy, 16:1 – kwas oleopalmitynowy, 18:0 – kwas stearynowy, 18:1 – kwas oleinowy, 18:2 – kwas linolowy, 18:3 – kwas linolenowy.

Oprócz Pchlidu w PLB występują także barwniki karotenoidowe, zwłaszcza trans-wiolaksantyna i trans-luteina [2,17]. Zwiększenie zawartości trans-luteiny koreluje z akumulacją Pchlidu w komórkach rzodkiewnika zwyczajnego (*Arabidopsis thaliana*) [17].

W preparatach PLB wykryto obecność 64 białek, biorących udział w m.in. cyklu Calvina-Bensona, biosyntezie barwników, syntezie białek czy w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy [18]. Przegląd najważniejszych białek w PLB przedstawiono w Tabeli 1. Najbardziej obficie występującym białkiem w PLB jest LPOR, które stanowi nawet 95% całkowitej zawartości białka [18,19]. Enzym ten ma masę 35-38 kDa [5,20] i jest globularnym białkiem oddziałującym z błoną oraz zdolnym do tworzenia oligomerów [4]. Pomimo, że skład lipidowy PLB jest podobny do składu tylakoidów [21], to ilości poszczególnych składników lipidowych oraz ich względna zawartość różnią się. Stosunek zawartości monogalaktozylodiacylgliceroli (MGDG) do digalaktozylodiacylgliceroli

(DGDG) wynosi 1,6-1,8 [19,22,23]. PLB składa się także w niewielkim stopniu z fosfo- i sulfolipidów [19]. Dane dotyczące składu lipidowego PLB pszenicy zostały przedstawione w Tabeli 2. Jeśli chodzi o kwasy tłuszczowe, to ich skład nie odstaje od składu tylakoidów w chloroplastach [24].

Struktura PLB

Mikroskopia elektronowa ujawniła, że PLB

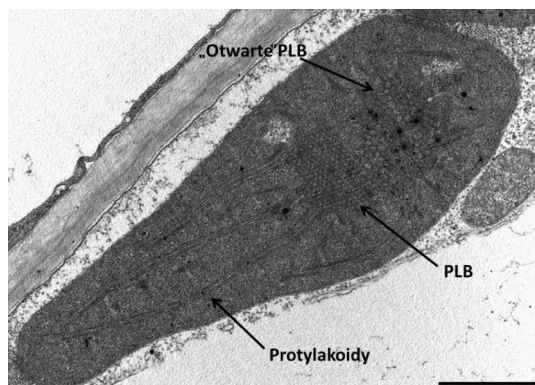


Fig. 2. Fotografia z mikroskopu elektronowego przedstawiająca 14-dniowy etiolowany liść pszenicy *Triticum aestivum*. Zaznaczone ciało prolamellarne przedstawia dwie formy morfologiczne – typową (bardziej kompaktową) i „otwartą” (luźniejszą). Skala - 1 μ m.

jest parakrystaliczną strukturą, otoczoną przez protylakoidy (Fig. 2) – układ błonowy przypominający tylakoidy stromy [3,25]. PLB i protylakoidy tworzą ciągły układ błon wewnątrz etioplastów [25].

PLB jest zbudowane z rozgałęzionych i wzajemnie połączonych tubul błonowych [26]. Budujące je dwuwarstwy lipidowe mają grubość 5-6 nm, a średnica światła tych tubul wynosi 5-10 nm [8,21]. Całkowita średnica PLB wynosi około 1 μm [26]. Lipidy, z których składają się tubule, tworzą ciągle fazy kubiczne [21], które nadają tym błonom krzywiznę, umożliwiającą osiągnięcie wysokiej gęstości błon – w 1 μm^3 PLB może się znajdować nawet 50 μm^2 błon lipidowych [27]. Powstawanie faz kubicznych w PLB jest podyktowane wysoką całkowitą zawartością lipidów oraz wysokim stosunkiem zawartości MGDG do pozostałych lipidów [21].

Najczęściej występującą podstawową jednostką organizacji rozgałęzionych tubul jest struktura czteroramienna (tetraedryczna), która zwykle układa się pierścień heksagonalny (przegląd w [2]). Rzadkością są struktury sześcioramienne, mogące tworzyć sieć sześcienną [2,28]. Ciekawą odmianą PLB jest tak zwane „otwarte” PLB, charakteryzujące się mniejszym stopniem upakowania błon, w porównaniu z innymi formami PLB (zob. Fig. 1). Jest ono zbudowane z tetraedrycznych jednostek, budujących skomplikowane wielościany, przywodzące na myśl klatraty cząsteczek wody utworzone wokół rozpuszczonych cząsteczek [27].

Istnieje kilka czynników, od których zależy stabilność złożonej struktury PLB. Jak wspomniano wyżej, istnienie faz kubicznych zależy od dużego stężenia lipidów stożkowatych (takich jak MGDG). Jednak

eksperymenty polegające na obniżeniu zawartości MGDG o około połowę w wyniku mutacji syntazy MGDG nie wykazały zmian w ultrastrukturze PLB [29]. Oznacza to, że szczególny skład lipidowy błon PLB nie jest jedynym czynnikiem wymaganym do ich powstania.

Zaproponowano, że białka, takie jak LPOR, rozłożone asymetrycznie mogą powodować zakrzywienia błon lipidowych [30]. Zostało to poparte badaniami, które pokazały, że LPOR asocjuje ze stromalną stroną błon PLB [31]. Świadczy to o możliwym udziale tego białka (w kompleksach z substratem i kofaktorem) w kształtowaniu i stabilizowaniu struktury PLB. Ważnym czynnikiem jest także sam kofaktor LPOR – NADPH, który umożliwia asocjację tego białka z błonami PLB [31,32].

Kolejnym istotnym czynnikiem jest obecność karotenoidów. Wykazano, że niedobór karotenoidów, spowodowany traktowaniem norflurazonem (inhibitorem desaturacji fitoenu), powoduje słabsze związanie LPOR z błonami PLB [33]. Znaczenie ma też sama struktura cząsteczek karotenoidów. Park i współaut. zaproponowali, że transkarotenoidy (o liniowej budowie) stabilizują krzywiznę błon, spowodowaną obecnością kompleksów Pchl_{id}:LPOR:NADPH. Z kolei poli-cis-karotenoidy (wykazujące „schodkową” budowę) destabilizują krzywiznę błon PLB, poprzez zmianę ich płynności [34]. Wykazano także, że mutant *Arabidopsis thaliana* ccr2, odznaczający się znacznym obniżeniem produkcji luteiny, nie wykazuje obecności PLB [35].

Indukowane światłem zmiany w PLB

Oświetlenie, którego efektem jest fotoredukcja Pchl_{id} do Chl_{id}, powoduje stopniową dezintegrację regularnej struktury

PLB. Początkowo dochodzi do zwiększenia rozmiarów PLB i rozluźnienia jego tubularnej struktury, a następnie do formowania małych pęcherzyków [26]. Następnie od powierzchni PLB zaczynają odchodzić struktury przypominające protylakoidy.

Powstały po fotoredukcji Chlid wykazuje maksimum fluorescencji przy 685-693 nm. To maksimum stopniowo przesuwa się w stronę fal krótszych, by po upływie ok. pół godziny osiągnąć wartość 675-682 nm [26,36]. Ten efekt, obserwowany również w widmach absorpcji, określany jest jako „przesunięcie Shibaty” [37]. Szybkość zmian spektralnych obserwowanych w izolowanych błonach etioplastów zależy od takich czynników jak stężenie sacharozy, glicerolu, NADPH, EDTA oraz od temperatury i stężenia jonów niektórych metali [38-40]. Mechanizm molekularny zmian obserwowanych jako przesunięcie Shibaty nie został jeszcze dokładnie poznany. Równocześnie z przesunięciem Shibaty zachodzą procesy takie jak rozpad struktury PLB, rozpad oligomerów LPOR, oddysocjowanie chlorofilidu od LPOR oraz synteza chlorofilu (przegląd w [2]). Niedawne badania pokazały, że w izolowanych błonach etioplastów przesunięcie Shibaty zostaje ukończone przed całkowitą dyspersją PLB [26].

Hipoteza o fotoprotekcyjnej roli PLB

W wyniku oddziaływania światła z wolnymi tetrapiolami, takimi jak Pchlid lub Chlid, dochodzi do powstania wolnych rodników tlenowych [41]. Wzbudzony Pchlid lub Chlid w stanie trypletowym może reagować z tlenem trypletowym, co prowadzi do powstania tlenu singletowego, oraz w kon-

sekwencji innych wolnych rodników [4]. Uszkadzają one m.in. białka oraz błony, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki [1]. Uważa się, że obecność PLB pozwala uniknąć uszkodzeń spowodowanych przez wolne rodniki. Po pierwsze, w ciemności dochodzi do akumulacji kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH. Umożliwia to szybką przemianę Pchlidu do Chlidu od razu po oświetleniu tkanki. Dzięki temu cząsteczki Pchlidu ulegają fotoredukcji, a nie fotooksydacji [1]. Po drugie, wykorzystywany jest mechanizm tzw. mikrocyklu chlorofilidu [4]. Polega on na tym, że w kompleksach LPOR z Chlidem dochodzi do wymiany NADP⁺ (powstającego po fotoredukcji Pchlidu) na NADPH. Energia świetlna zaabsorbowana przez Chlid w kompleksie z LPOR i NADPH prowadzi do utlenienia NADPH (a nie Chlidu), który jest następnie wymieniany na nową cząsteczkę NADPH i cykl może się powtórzyć [4].

Podsumowanie

Ciało prolamellarne jest ciekawą strukturą, nie tylko pod względem nietypowej, parakrystalicznej budowy. Jest ono bezpośrednim prekursorem rozwoju chloroplastów w przypadku etiolowanych tkanek, gromadzącym białka i lipidy niezbędne do wytworzenia tylakoidów. Ponadto PLB umożliwia szybkie wznowienie biosyntezy chlorofilu po okresie naturalnej etiolacji. Kompleksy zawarte w tej strukturze pozwalają na znaczące ograniczenie produkcji wolnych rodników, generowanych przez wolne barwniki, takie jak protochlorofilid. Wyjaśnienie roli PLB przyczyni się do zrozumienia mechanizmów rozwoju aparatu fotosyntetycznego i procesu deetiolacji okrytonasiennych.

Bibliografia:

- [1] Solymosi K, Schoefs B., Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth Res.* 2010 Aug;105(2):143-66
- [2] Solymosi K., Aronsson H., Etioplasts and their significance in chloroplast biogenesis [W]: *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*, red. Biswal B., Krupinska K., Biswal U.C., Springer Netherlands, 2013, str. 39-71
- [3] Mysłiwa-Kurczel B., Strzałka K., Indukowana światłem redukcja protochlorofilidu u okrytonasiennych a rozwój chloroplastów, *Postępy Biochemii* 56 (4) 2010, str. 418-426
- [4] Schoefs B., Franck F., Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolutions, *Photochem Photobiol.*, 2003 Dec;78(6), str. 543-57
- [5] Oliver RP, Griffiths WT, Identification of the polypeptides of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase, *Biochem J.* 1980 Oct 1;191(1), str. 277-280
- [6] Heyes DJ, Hunter CN, Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase, *Trends Biochem Sci.* 2005 Nov30(11), str. 642-649
- [7] Leyon H., The structure of chloroplasts. IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast, *Exp Cell Res.* 1954 Aug;7(1), str. 265-273.
- [8] Gunning BES., The greening process in plastids. 1. The structure of the prolamellar body, *Protoplasma*, 1965, Volume 60, Issue 1, str. 111-130
- [9] Klein S., Schiff JA., The Correlated Appearance of Prolamellar Bodies, Protochlorophyll(ide) Species, and the Shibata Shift during Development of Bean Etioplasts in the Dark. *Plant Physiology*. 1972;49(4):619-626
- [10] Sperling U. et al. Etioplast differentiation in *Arabidopsis*: both PORa and PORb restore the prolamellar body and photoactive protochlorophyllide-F655 to the cop1 photomorphogenic mutant, *Plant Cell.* 1998 Feb;10(2):283-296.
- [11] Whatley JM., Chloroplast Development in Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris*, *New Phytologist*, Vol. 73, No. 6 (Nov., 1974), str. 1097-1110
- [12] Kruk J., Occurrence of chlorophyll precursors in leaves of cabbage heads - the case of natural etiolation, *J Photochem Photobiol B.*, 2005 Sep 1;80(3):187-194
- [13] Solymosi K., Böddi B., Optical properties of bud scales and protochlorophyll(ide) forms in leaf primordia of closed and opened buds, *Tree Physiol.* 2006 Aug;26(8):1075-1085
- [14] Smith H., Light Quality, Photoperception, and Plant Strategy, *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, Vol. 33: 481-518
- [15] Robertson D., Laetsch WM., Structure and Function of Developing Barley Plastids, *Plant Physiology*, 1974;54(2):148-159
- [16] Masuda T., Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls, *Photosynth Res.*, 2008, May;96(2):121-43
- [17] Mysłiwa-Kurczel B., et al., Variations in xanthophyll composition in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana* correlate with protochlorophyllide accumulation, *Acta Biochim Pol.* 2012;59(1):57-60.
- [18] Blomqvist LA., Ryberg M., Sundqvist C., Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development, *Photosynth Res.* 2008 Apr;96(1):37-50
- [19] Selstam E., Sandelius AS., A Comparison between Prolamellar Bodies and Prothylakoid Membranes of Etioplasts of Dark-Grown Wheat Concerning Lipid and Polypeptide Composition, *Plant Physiol.*, 1984, Dec;76(4):1036-40.
- [20] Selstam E., Widell A., Characterization of prolamellar bodies, from dark-grown seedlings of Scots pine, containing light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase, *Physiologia Plantarum*, 1986, 67: 345-352.
- [21] Selstam E., Development of Thylakoid Membranes with Respect to Lipids [W:] *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, red. Siegenthaler Paul-André, Murata Norio, Springer Netherlands, 1998, str. 209-224
- [22] Ryberg M., Sandelius AS., Selstam E., Lipid composition of prolamellar bodies and prothylakoids of wheat etioplasts, *Physiologia Plantarum*, 1983, 57: 555-560.
- [23] Protoschill-Krebs G., Kesselmeier GJ., Prolamellar bodies of oat, wheat, and rye: Structure, lipid composition, and adsorption of saponins, *Protoplasma*, February 1988, Volume 146, Issue 1, str. 1-9
- [24] Bahl J., Francke B., Monéger R., Lipid composition of envelopes, prolamellar bodies and other plastid membranes in etiolated, green and greening wheat leaves, *Planta*, 1976 Jan;129(3):193-201
- [25] Sundqvist C., Dahlin C., With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes, *Physiol Plant*, 1997, 100:748-759
- [26] Grzyb JM., Solymosi K., Strzałka K., Mysłiwa-Kurczel B., Visualization and characterization of prolamellar bodies with atomic force microscopy, *J Plant Physiol*, 2013, Sep 15;170(14):1217-1227
- [27] Gunning BES., Membrane geometry of "open" prolamellar bodies, 2001, *Protoplasma*, 215:4-15
- [28] Murakami S., et al., Three dimensional structure of the prolamellar body in squash etioplasts, *Protoplasma*, 1985, 128:147-156
- [29] Jarvis P. et al., Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:8175-8179
- [30] Williams WP., Selstam E., Brain T., X-ray diffraction studies of the structural organisation of prolamellar bodies isolated from *Zea mays*, *FEBS Lett.* 1998 Jan, 30;422(2):252-4
- [31] Aronsson H., Sundqvist C., Dahlin C., POR - import and membrane association of a key element in chloroplast development, *Physiol Plant*, 2003, 118:1-9
- [32] Engdahl S. et al, Association of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) with isolated etioplast inner membranes from wheat, *Plant J.* 2001, 27:297-304
- [33] Denev ID. et al, Organization of protochlorophyllide oxidoreductase in prolamellar bodies isolated from etiolated carotenoid-deficient leaves as revealed by fluorescence probes, *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1716:97-103
- [34] Park H. et al., Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis, *Plant Cell*, 2002, 14:321-332
- [35] Cuttriss AJ. et al, Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*, *Functional Plant Biology*, 2007, 34, 663-672.
- [36] Domanskii VP., Rüdiger W., On the nature of the two pathways in chlorophyll formation from protochlorophyllide, *Photosynthesis Research*, May 2001, Volume 68, Issue 2, str. 131-139
- [37] Shibata K., Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves, *J Biochem*, 1957, 44:147-173
- [38] Lin BZ. et al, The Shibata shift: effects of in vitro conditions on the spectral blue-shift of chlorophyllide in irradiated isolated prolamellar bodies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 36, Issue 3, December 1996, str. 263-270
- [39] Mysłiwa-Kurczel B., Strzałka K., Influence of selected heavy metal ions on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide, *Agr. Ecosyst. Environ.*, 2005, 106, str. 199-207
- [40] Solymosi K., Mysłiwa-Kurczel B., Bóka K., Strzałka K., Böddi B., Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg²⁺, *Plant Biol.*, 2006, 8, str. 627-635
- [41] Erdei N., Barta C., Hideg E., Böddi B., Light-induced wilting and its molecular mechanism in epicotyls of dark-germinated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings, *Plant Cell Physiol*, 2005, 46:185-191

Rola oksygenazy hemowej 1 w odpowiedzi na G-CSF, podawany u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, z powodu neutropenii indukowanej chemioterapią

Joanna Włodek^{1,2}, Karolina Najder³, Aleksandra Wieczorek⁴, Elżbieta Trzyna⁵,
Karolina Bukowska-Straková^{1,3}.

¹Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Instytut Pediatrii, Katedra Immunologii i Transplantologii Klinicznej, Zakład Immunologii Klinicznej

²Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmacji, Oddział Analityki Medycznej V rok, studia magisterskie

³Uniwersytet Jagielloński, WBBiB, Zakład Biotechnologii Medycznej,

⁴Uniwersytet Jagielloński, Wydział Lekarski, Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej

⁵Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Instytut Pediatrii, Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Zakład Transplantologii

asia.wlodek91@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr Karoliny Bukowskiej Strakováowej

Jednym z ciężkich powikłań występujących w przebiegu chemoterapii jest neutropenia (chemotherapy induced neutropenia - CIN). CIN predysponuje do ciężkich zakażeń, które są z kolei najczęstszą przyczyną śmierci w okresie chemioterapii. CIN jest wskazaniem do redukcji dawek chemioterapii i jest najczęstszym powodem opóźnień leczenia, co niekorzystnie wpływa na końcowy wynik leczenia nowotworu. Aby skrócić czas trwania CIN i ograniczyć ryzyko infekcji stosuje się czynniki stymulujące wzrost granulocytów (G-CSF). Jednak czas powrotu poziomu granulocytów do wartości oczekiwanych jest różny u różnych pacjentów - najczęściej trwa około 2-3 dni, czasem jednak konieczne jest podawanie G-CSF dłużej niż tydzień.

Chemioterapia prowadzi również do indukcji wielu mechanizmów cytoprotekcyjnych, w tym np. do aktywacji oksygenazy hemowej 1 (HO-1). Podstawową funkcją HO-1 jest rozkład toksycznego hemu do tlenku węgla (CO), Fe i biliwerdyny. Badania na modelu mysim wykazały, że częściowy niedobór tego enzymu prowadzi do zaburzeń w odpowiedzi komórek macierzystych na stres.

U ludzi występują częste polimorfizmy rejonu promotorowego genu kodującego HO-1 (HMOX1), które wpływają na poziom transkrypcji HMOX1 i aktywność samego enzymu. Można zatem przypuszczać, że poziom indukcji HO-1 u danego pacjenta w odpowiedzi na chemioterapię, będzie zależny od obecności danego polimorfizmu.

Celem badań była ocena poziomu mRNA dla HO-1 u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL), w czasie lub po zakończeniu chemioterapii. Ponadto, w pracy zbadano korelację częstości

wystąpienia CIN z występowaniem danego polimorfizmu rejonu promotorowego genu kodującego HO-1 (HMOX1) oraz z czasem powrotu poziom granulocytów po podaniu G-CSF, do wartości oczekiwanych.

Do badań zostali zakwalifikowani pacjenci Oddziału i Poradni Onkologii i Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, u których w latach 2010-2015 zdiagnozowano ALL, oraz u których w trakcie leczenia wystąpiła neutropenia, z powodu której zastosowano leczenie G-CSF. Badanym materiałem była krew obwodowa.

W badanych próbkach wykazano istotnie statystycznie podwyższony poziom mRNA dla HO-1, w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano także, że polimorfizm typu krótkiego w obrębie promotora genu HMOX1 może mieć związek z częstszym występowaniem CIN.

Wstęp

Granulopoeza

Granulopoeza jest procesem, w przebiegu którego z krwiotwórczych komórek macierzystych (hematopoietic stem cells - HSCs) powstają dojrzałe granulocyty, a głównym miejscem ich powstawania jest szpik kostny. Granulocyty żyją na obwodzie jedynie od 3 do 6 godzin, zatem w celu zachowania homeostazy codziennie produkowane są znaczne ilości granulocytów. Dziennie ze szpiku kostnego do krwi obwodowej uwalniany jest około miliard granulocytów na kilogram masy ciała, natomiast część powstałych granulocytów pozostaje w szpiku kostnym, tworząc tzw. rezerwę szpiku kostnego. Z puli tej neutrofile mogą być mobilizowane w stanach zapalnych lub w odpowiedzi na zakażenie, co powoduje szybki wzrost liczby krążących granulocytów obojętnochłonnych. Dodatkowo, w stanach „awaryjnych”, tj. infekcja, następuje ukierunkowanie różnicowania HSCs do linii mieloidalnej oraz stymulacja końcowego dojrzewania progenitorów granulocytarnych w szpiku kostnym, co powoduje skrócenie czasu potrzebnego do wytworzenia

dojrzałych form. Proces ten jest regulowany poprzez szereg mechanizmów zewnętrznych i wewnątrzkomórkowych.

Istotnym czynnikiem działającym zewnątrzkomórkowo jest czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytarnych (G-CSF), który działa poprzez receptor G-CSFR. Do podstawowych funkcji G-CSF należy regulacja wytwarzania i proliferacji progenitorów linii granulocytarnej oraz uwalniania ze szpiku kostnego do krwi obwodowej dojrzałych granulocytów obojętnochłonnych. Działanie G-CSF prowadzi także do degranulacji dojrzałych neutrofilów, w trakcie której dochodzi do uwalniania elastazy. Enzym ten przecina nisze szpikowe, co skutkuje uwolnieniem komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej. Dodatkowo G-CSF powoduje ukierunkowanie komórek progenitorowych do różnicowania w stronę linii granulocytarnej. G-CSF łączy się ze swoistym receptorem cytokinowym, zwanym G-CSF receptor (G-CSFR, w nomenklaturze „CD” opisywanym jako CD114), którego ekspresję wykazano przede wszystkim na granulocytach obojętnochłonnych czy

monocytach, ale także na komórkach niehematopoetycznych oraz komórkach nowotworowych.

Regulacja granulopoezy odbywa się również poprzez czynniki wewnątrzkomórkowe, głównie za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych z rodziny C/EBP (białka wiążącego sekwencje wzmacniające CCA-AT)[26] (Rys. 3).[27]

C/EBP β reguluje proliferację progenitorów linii granulocytarnej oraz odgrywa zasadniczą rolę w granulopoezie związanej ze stresem. Co ciekawe, wykazano, że poziom tego czynnika może być negatywnie regulowany m.in. przez tlenek węgla (CO), ponieważ CO hamuje jego translokację do jądra komórkowego. Co ciekawe, CO fizjologicznie powstaje w komórkach wskutek aktywności enzymatycznej oksygenazy hemowej, rozkładającej hem m.in. właśnie do CO.

Oksygenaza hemowa 1 (HO-1)

Oksygenaza hemowa 1 (HO-1) jest enzymem rozkładającym toksyczny hem do tlenku węgla (CO), żelaza i biliwerdyny, które mają właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Oksygenaza hemowa występuje w trzech izoformach, które są kodowane przez odrębne geny. Najlepiej poznaną formą jest HO-1, która jest enzymem indukowalnym poprzez szereg czynników stresowych, m.in. wzrastające stężenie hemu, stres oksydacyjny, endotoksyny, promieniowanie UV, hipoksję, czy w odpowiedzi na chemioterapię. Doniesienia ostatnich lat wskazują na fakt, iż HO-1

bierze udział w regulacji dojrzewania wielu tkanek i komórek, m.in. tkanki kostnej czy komórek hematopoetycznych, a ekspresja tego enzymu ulega zmianie podczas różnicowania komórek hematopoetycznych. Niedobór HO-1 prowadzi natomiast do zaburzeń w odpowiedzi komórek macierzystych na stres. U ludzi całkowity brak HO-1 występuje niezwykle rzadko, natomiast powszechnie spotykane są różnice w poziomie ekspresji HO-1, które wynikają z obecności polimorfizmów w obrębie promotora genu kodującego HO-1 (HMOX1).

Polimorfizmy promotora HMOX1

Wyróżnia się dwa rodzaje polimorfizmów w obrębie promotora genu HMOX1:

- Polimorfizm długości dinukleotydu (GT)ⁿ
- Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (G lub T).

U ludzi, różnice międzyosobnicze w aktywności HO-1 najczęściej związane są z występowaniem polimorfizmów w zakresie liczby powtórzeń GT. Mniejsza liczba powtórzeń GT jest związana z wyższym poziomem transkrypcji genu kodującego HO-1 oraz wyższą aktywnością samego enzymu.

Wyróżnia się trzy podtypy polimorfizmów w zależności od liczby powtórzeń GT w obrębie genu promotorowego HO-1, które zostały przedstawione w poniższej tabeli:

Znaczący wpływ długości promotora genu HMOX1 na aktywność enzymatyczną HO-1, indukowaną przez stres oksydacyjny, odnotowano w przypadku, kiedy liczba po-

Ilość powtórzeń GT	Typ polimorfizmu
<25	S- short
25-28	M- middle
≥29	L- long

Tabela 1. Zestawienie ilości powtórzeń GT z danymi typami polimorfizmów.

wtórzeń GT była niższa od 25, czyli w przypadku występowania polimorfizmu podtypu S. Ponadto, wykazano, że do zwiększonej aktywności HO-1 wystarczająca jest obecność tylko jednego allelu krótkiego. Co ciekawe, wykazano również, że komórki białaczkowe od pacjentów z mniejszą liczbą powtórzeń, były bardziej odporne na apoptozę indukowaną oksydantami.

Neutropenia

Neutropenia jest stanem hematologicznym, który polega na obniżeniu liczby granulocytów obojętnochłonnych poniżej 1500/ μ l. Neutropenia często występuje jako powikłanie terapii cytotoksycznej stosowanej w trakcie leczenia chorób nowotworowych (chemotherapy induced neutropenia - CIN).

Neutropenia stanowi poważne zagrożenie życia z powodu znacznej predyspozycji chorych do ciężkich zakażeń (bakteryjnych, wirusowych czy grzybiczych), które są z kolei najczęstszą przyczyną śmierci w okresie chemioterapii. Ciężka neutropenia jest wskazaniem do redukcji dawek chemioterapii i najczęstszym powodem opóźnień leczenia, co niekorzystnie wpływa na końcowy wynik leczenia nowotworu. Aby skrócić czas występowania neutropenii i gorączki neutropenicznej, podaje się czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytarnych (G-CSF). Czas leczenia G-CSF nie jest ściśle określony i waha się od 2 do 14 dni.

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

Najczęstszym nowotworem wieku dziecięcego jest ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), która stanowi 85% wszystkich nowotworów występujących u dzieci. W

przebiegu ALL obserwuje się niekontrolowaną proliferację i akumulację niedojrzałych limfoblastów. Lokalizują się one w szpiku kostnym, we krwi obwodowej, czy węzłach chłonnych. Pomimo znacznych postępów w leczeniu białaczek u dzieci, wciąż największym problemem są wznowy choroby i powikłania związane z samą chemioterapią.

Cel pracy

Celem pracy była ocena poziomu HO-1 po chemioterapii, a także zbadanie korelacji występowanie danego polimorfizmu rejonu promotorowego genu kodującego HO-1, z liczbą występujących incydentów neutropenii i z czasem powrotu poziomu granulocytów po podaniu G-CSF, do wartości oczekiwanych.

Materiały i metody

Grupa badana

Grupę badaną stanowili pacjenci leczeni na Oddziale lub w Poradni Onkologii i Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, u których w latach 2010-2015 zdiagnozowano ostrą białaczkę limfoblastyczną, oraz u których w trakcie terapii występowała neutropenia, z powodu której niezbędne było leczenie czynnikiem stymulującym powstawanie granulocytów (G-CSF). Szczegółowe informacje dotyczące przebiegu leczenia oraz incydentów neutropenii pozyskiwane były ze szpitalnej historii chorób pacjentów.

Ocena odpowiedzi na G-CSF

Dokonano podziału pacjentów pod kątem dobrej i złej odpowiedzi na leczenie G-CSF. Wyliczono współczynnik określający dzienny przyrost granulocytów. Przyjęto wartość graniczną 1,3. Pacjenci, posiadający

współczynnik $\leq 1,3$ klasyfikowani byli do grupy źle odpowiadającej na leczenie G-CSF, natomiast gdy współczynnik wynosił $> 1,3$ pacjenci kwalifikowani byli do grupy dobrze odpowiadającej na leczenie. Ponadto, dla każdego pacjenta obliczono ilość cykli podawania G-CSF, co odzwierciedlało liczbę incydentów CIN u danego pacjenta.

Materiał badany

Materiał badany stanowiła krew obwodowa, która była pobierana podczas rutynowych wizyt kontrolnych (nr zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego: KBET/76/B/2014).

Wykorzystywane metody

W pierwszym etapie dokonywano izolacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (Peripheral blood mononuclear cells-PBMCs) z krwi obwodowej pacjentów pobranej na antykoagulant EDTA. Rozdziału dokonywano poprzez wirowanie krwi w gradiencie fikolu (Isopaque/Ficoll). Użytkowaną peletkę komórkową zabezpieczano do dalszych eksperymentów. W kolejnym etapie przeprowadzano izolację RNA przy użyciu RNeasy® Mini Kit. Po zakończeniu procedury mierzono stężenia RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop.

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Próbki RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji i poliadenylacji z użyciem NCode™ VILO™ miRNA cDNA Synthesis Kit (Life Technologies). Dzięki dodawaniu łańcucha poli(A) do końca 3' cząsteczek, możliwa była analiza zarówno mRNA, jak i miRNA. W kolejnym etapie próbki analizo-

wano w oparciu o ilościowy PCR z użyciem SYBR® Green JumpStart™ Taq Ready-Mix™ (Sigma- Aldrich). Reakcję prowadzono na płytce 96-dołkowej w termocyklerze StepOne Plus (Applied Biosystems).

Genotypowanie polimorfizmów długości promotora oksygenazy hemowej 1

Metodą służącą do wykrywania tego typu polimorfizmów jest amplifikacja rejonu promotorowego poprzez reakcję PCR z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych starterów, a następnie analizę fragmentów na sekwenatorze.

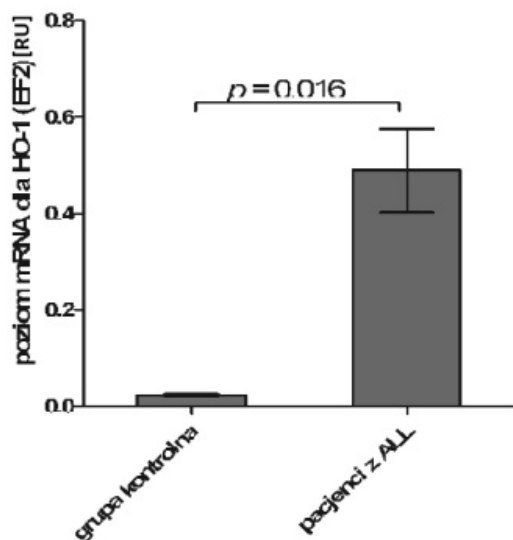
W pierwszym etapie z zabezpieczonych próbek krwi obwodowej izolowano DNA przy użyciu zestawu Syngen Blood/Cell DNA Mini Kit zgodnie ze wskazaniem producenta. Po zakończeniu procedury mierzono stężenia DNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop.

Reakcja PCR

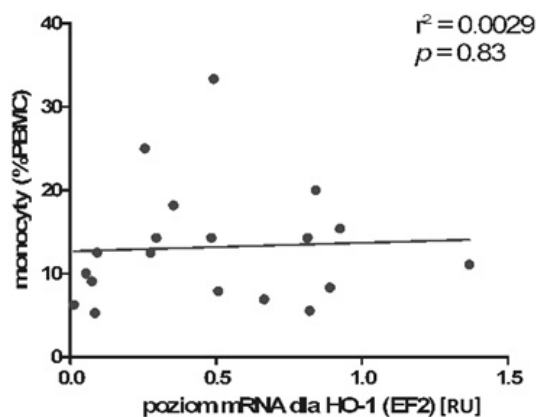
Do reakcji PCR wykorzystywano startery, z których jeden został wyznakowany na końcu 5' za pomocą karboksyfluoresceiny. (6-FAM).

Analiza na sekwenatorze

Próbki były zawieszane w formamidzie z dodatkiem standardu wielkości GeneScan™350 ROX Size Standard, a następnie próbki były denaturowane. Do analizy próbek niezbędne było przygotowanie matrycy zawierającej cztery barwniki: 6-FAM, 6-HEX, NED i ROX. Próbki rozdzielano na sekwenatorze ABI PRISM 310 Genetic Analyzer przy użyciu żelu Performance Optimized Polymer 4 POP-4.



Rys. 1 Poziom mRNA dla HO-1 w grupie kontrolnej i u pacjentów z ALL (RU- relative units; jednostki względne).



Rys. 2 Zależności poziomu mRNA dla HO-1 od procentowego udziału monocytów w PBMC. Ocena regresji liniowej: $r^2 = 0,0029$ przy $p = 0,83$ (RU- relative units; jednostki względne)

Wyniki

Ocena poziomu ekspresji HO-1

U pacjentów poddawanych chemioterapii cytotoksycznej obserwowano znacząco wyższy poziom mRNA dla HO-1, w porównaniu z grupą kontrolną. Najprawdopodobniej było to związane z faktem, iż HO-1 jest enzymem cytoprotekcyjnym, induk-

wanym poprzez szereg czynników, w tym właśnie chemioterapię. (Rys 1.)

Ponieważ najwyższy poziom HO-1 fizjologicznie obserwowany jest w monocytach, postanowiono sprawdzić, czy uzyskane wyniki, wskazujące na wyższy poziom mRNA dla HO-1 u pacjentów po chemioterapii, nie są pochodną wyższego odsetka monocytów w badanych próbkach. Jednak pomiędzy poziomem mRNA dla HO-1 a udziałem procentowym monocytów w PBMC nie wykazano korelacji (Spearman $r = 0,18$ przy $p = 0,45$).

Ocena polimorfizmów występujących u pacjentów

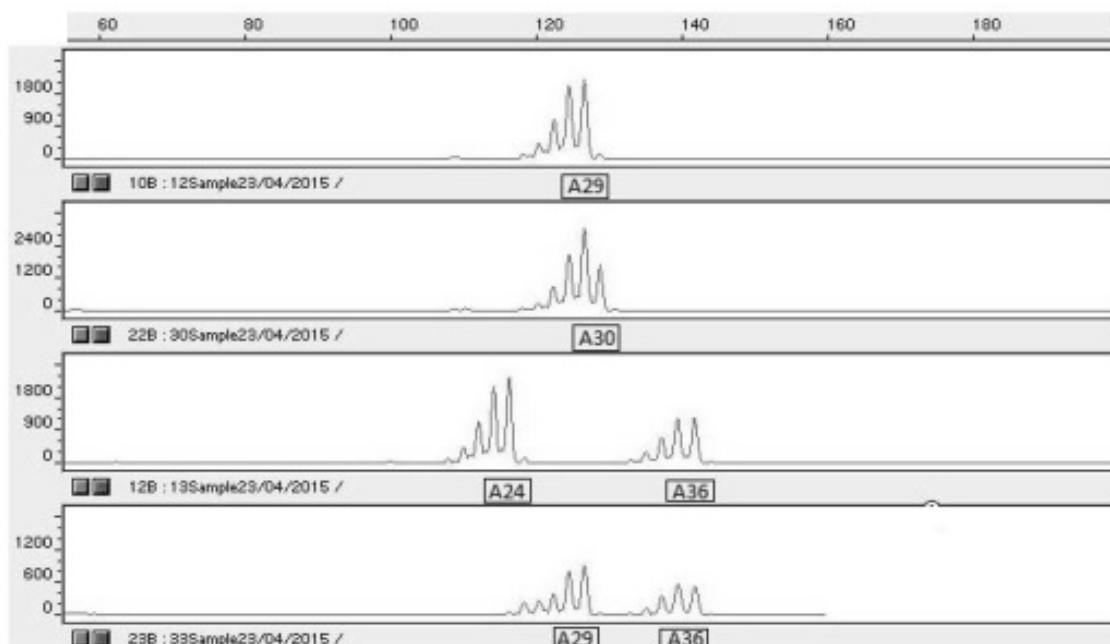
W dalszej części badań opracowano metodę oceny długości polimorfizmów:

Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy obecnością konkretnego polimorfizmu, a dobrą czy złą odpowiedzią na leczenie G-CSF. W kolejnym etapie postanowiono sprawdzić, czy występuje zależność pomiędzy obecnością danego polimorfizmu, a ilością przypadków neutropenii u danego pacjenta.

U pacjentów posiadających polimorfizm krótki (przynajmniej jeden allel S) wykazano widoczną tendencję do większej liczby incydentów neutropenii, w porównaniu do pacjentów posiadających polimorfizm długi (LL), jednak różnica ta nie osiągnęła statystycznej istotności ($p = 0.055$). Konieczne jest przeprowadzenie powyższej analizy na większej liczbie pacjentów.

Dyskusja

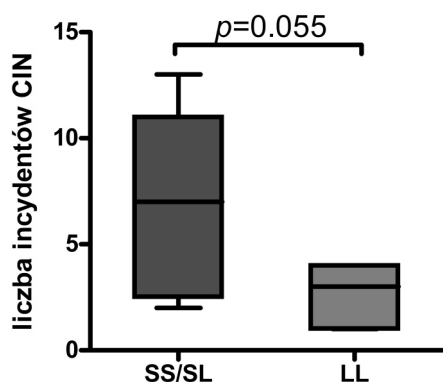
Oksygenaza hemowa 1 odgrywa istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, pełniąc funkcję enzymu cytoprotekcyjnego,



Rys3 Elektroforegramy przedstawiające różne typy polimorfizmów występujących u pacjentów. (Próbka nr 2- polimorfizm SL; próbka nr 17- polimorfizm SL; próbka nr 25- polimorfizm SS; próbka nr 30- polimorfizm LL) .



Rys. 4 Rozkład częstości dobrej i złej odpowiedzi na leczenie G-CSF w grupie pacjentów, u których był obecny chociaż jedno allele krótki (SS, SL) i w grupie pacjentów, u których allele krótki nie występował (LL).



Rys. Ocena liczby incydentów neutropenii u pacjentów w zależności od obecności, bądź braku polimorfizmu tyłu krótkiego..

ale również jest związana z procesami patologicznymi, np. chorobami układu krążenia, czy nowotworami. W wielu typach nowotworów wykazano, że ekspresja HO-1 jest zwiększona, co wiązało się z przyspieszonym wzrostem guzów pierwotnych i tworzeniem się przerzutów. Nadekspresja HO-1 bardzo często występuje w raku prostaty, nerek, czy też w ostrych białaczkach szpikowych. Co ciekawe terapia przeciwnowotworowa uruchamia mechanizmy obronne komórek, które prowadzą do zwiększonej ekspresji wielu enzymów cytoprotekcyjnych, w tym właśnie do wzrostu ekspresji HO-1. Może to mieć negatywne znacznie w komórkach nowotworowych, jako że komórki te, dzięki wyższej aktywności HO-1, mogą być bardziej odporne na leczenie, co potwierdzono w przypadku chorych z ostrą białaczką szpikową AML. Analiza wyników badań prowadzonych

przez nasz zespół wykazała, że poziom mRNA dla HO-1 jest znacząco wyższy w przypadku pacjentów, którzy poddawani byli chemioterapii w przebiegu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Próbkę krwi pozyskiwano od pacjentów w czasie badań kontrolnych, które były przeprowadzane w trakcie lub po zakończeniu chemioterapii podtrzymującej remisję. W tym czasie we krwi obwodowej nie stwierdzano obecności komórek białaczkowych. Należy więc wnosić, że podwyższony poziom mRNA dla HO-1 w tej grupie najprawdopodobniej był wtórny do leczenia cytotoksycznego, a nie był wynikiem nadekspresji HO-1 w samych komórkach białaczkowych. Dodatkowo zbadano, czy zwiększona ekspresja HO-1 nie jest wynikiem różnorodnego składu komórkowego badanych próbek, ponieważ wysoki poziom HO-1 obserwuje się w monocytach. Nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy zwiększoną ekspresją HO-1, a wysokim poziomem monocytów w badanym materiale, co wskazuje na fakt, że zmierzony poziom mRNA dla HO-1 nie wynika ze zwiększonego odsetka monocytów.

U ludzi niezmiernie rzadko występuje całkowity brak HO-1, natomiast powszechnym zjawiskiem jest występowanie polimorfizmów długości w obrębie promotora genu HMOX1. W przypadku rasy kaukaskiej najczęściej występującym polimorfizmem jest typ SL. Potwierdziły to wyniki badań prowadzonych w naszej grupie. U ponad 50% pacjentów stwierdziliśmy obecność polimorfizmu SL.

Wykazano, że mniejsza ilość powtórzeń (GT) występująca w proksymalnej części promotora genu kodującego HO-1 ((GT)-short) jest związana z wyższą aktywnością transkrypcyjną genu HMOX1, i tym samym

z większą aktywnością samego enzymu. Łatwiejsza indukcja HO-1 w przypadku krótkich polimorfizmów, może powodować większą produkcję CO, a co za tym idzie, może prowadzić do hamowania translokacji C/EBP β do jądra komórkowego i ograniczenie proliferacji progenitorów granulocytarnych. Dlatego w naszych badaniach poddaliśmy analizie związek obecności danego polimorfizmu z neutropenią indukowaną chemioterapią oraz odpowiedzią pacjentów na G-CSF.

Dokonałymi próby korelacji obecności konkretnego typu polimorfizmu z dobrą lub złą odpowiedzią na G-CSF. Ocenę związku obecności danego typu polimorfizmu z odpowiedzią na G-CSF utrudnia jednak fakt, że w dostępnej szpitalnej dokumentacji medycznej nie ma pełnej informacji co do czasu przyjmowania G-CSF przez pacjenta. Jeśli bowiem stan pacjenta jest wystarczająco dobry, pacjenci otrzymują lek nie tylko w trakcie hospitalizacji czy wizyt ambulatoryjnych, ale także w trakcie domowej rekonwalescencji. Z tego powodu w wielu przypadkach niemożliwe było uzyskanie informacji w szpitalnej historii choroby pacjenta o końcowej ilości granulocytów, czy też liczbie dni, w trakcie których był przyjmowany lek. Bardziej miarodajne wydawało się więc określenie liczby cykli podań G-CSF, a tym samym skłonność danego pacjenta do rozwinięcia incydentów CIN w trakcie leczenia chemotoksycznego. Dlatego analizie poddaliśmy liczbę cykli podawania G-CSF w zależności od polimorfizmu promotora genu HMOX1

Uzyskane przez nas wyniki wskazują na występującą zależność pomiędzy występowaniem danego polimorfizmu, a częstością incydentów neutropenii u danego pacjenta. W przypadku występowania przynajmniej

jednego allelu S, liczba incydentów była znacząco wyższa w porównaniu z pacjentami, u których nie występował allel krotki. Wyniki przeprowadzonych analiz mogą wskazywać, że obecność allelu krótkiego, a co za tym idzie łatwiejsza transkrypcja i wyższa aktywność enzymatyczna HO-1 w odpowiedzi na czynniki stresogenne, takie jak chemioterapia, może powodować wyższą produkcję CO, a co z tym idzie, hamowanie translokacji C/EBP β do jądra komórkowego i ograniczenie proliferacji progenitorów linii granulocytarnej i w konsekwencji rozwój neutropenii, co skutkuje to koniecznością częstszego stosowania G-CSF. Niemniej jednak powstaje

pytanie, czy przy opisywanym zjawisku, ważniejsze znaczenie ma indukcja HO-1 w komórkach mikrośrodowiska szpiku czy też w samych komórkach linii granulocytarnej?

Podsumowanie

Przedstawione wstępne wyniki badań stanowią obiecującą podstawę do dalszych badań dotyczących implikacji klinicznych roli HO-1 i polimorfizmów promotora genu HMOX1 w regulację granulopoezy. Obecnie badania są kontynuowane celem poszerzenia grupy badanej, a także w celu rozszerzenia analiz o nowe parametry i czynniki regulujące ekspresję HO-1.

Bibliografia:

- [1] G. Manz M., Boettcher S., Emergency granulopoiesis, *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14, 302-314.
- [2] Basu S., "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection, *Blood*, 2000, 95[12], 3725 - 3733.
- [3] Ward A., Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals, *Leukemia*, 2000, 14, 973-990.
- [4] Bendall L., G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent, *Elsevier*, 2014, 25[4], 355-367.
- [5] Basu S, G-CSF: function and modes of action, *Int J Mol Med*, 2002, 10 [1], 3-10.
- [6] Höglund M, The effect of granulocyte colony-stimulating factor [G-CSF] on the degranulation of secondary granule proteins from human neutrophils in vivo may be indirect., *Br J Haematol*, 1996, 93 [3], 558-68.
- [7] Fukunaga R., Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor., *Cell*, 1990, 61 [2], 341-50.
- [8] Lee J, G-CSF and GM-CSF concentrations and receptor expression in peripheral blood leukemic cells from patients with chronic myelogenous leukemia., *Ann Clin Sci*, 2008, 38 [4], 331-7.
- [9] Schneider A., The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis, *J Clin Invest.*, 2005, 115 [8], 2083-2098.
- [10] Wawrzyniec K., Czynn timer Stymulujący Tworzenie Kolonii Granulocytów [G-CSF] Jako Nowy Biomarker

W Spersonalizowanej Terapii Raka Jelita Grubego?, *Medycyna Fotodynamiczna*, 2013, 19[2], 148-53.

- [11] Hideyo H., Pu Z., Tajhal D., Christopher J, C/EBP[β] is required for 'emergency' granulopoiesis, *Nature Immunology*, 2006, 7: 732 - 739.

[12] Mahin D., THE HEME OXYGENASE SYSTEM: A Regulator of Second Messenger Gases, *Pharmacology and Toxicology*, 1997, 37, 517-554.

[13] Lyman GH. A comparison of international guidelines for the prevention of chemotherapy-induced neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2011, 18[1], 1-10.

[14] Otterbein L, Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 279[6], 1029-1037.

[15] Lee J, G-CSF and GM-CSF concentrations and receptor expression in peripheral blood leukemic cells from patients with chronic myelogenous leukemia., *Ann Clin Sci*, 2008, 38 [4], 331-7.

[16] Loboda, A., Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10[10], 1767-812.

[17] Lin C, Exacerbation of oxidative stress-induced cell death and differentiation in induced pluripotent stem cells lacking heme oxygenase-1, *Stem Cells Development*, 2012, 21[10], 1675-87.

[18] Ono, K., Association of a promoter variant of the haem oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J. Hypertens*. 2003, 21, 1497- 1503.

- [19] Grochot-Przeczek A., Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clinical Science* 2012, 122, 93-103.
- [20] Kaneda H, Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002, 22 [10], 1680-5.
- [21] M Exner, Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Microsatellite Polymorphism Is Associated with Restenosis after Percutaneous Transluminal Angioplasty., *Journal of Endovascular Therapy : An Official Journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 2001, 8 [5], 433-40.
- [22] Exner M, Minar E, Wagner O, The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease., *Free Radic Biol Med*, 2004, 37 [8], 1097-104.
- [23] Andrzej Szczeklik [red.]: Choroby wewnętrzne, tom II. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, 2005.
- [24] Lyman GH., Chemotherapy dose intensity and quality cancer care., *Oncology*, 2006, 20 [14], 16-25.
- [25] Hassan B, Filgrastim and antibiotics treatment reduces neutropenia severity in solid cancer patients., 2009, 10 [4], 641-4.
- [26] Michel G, Use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to increase chemotherapy doseintensity: a randomized trial in very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2000,18[7], 1517-24.
- [27] Pui C., Acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet*, 2008, 371, 1030-43.
- [28] Fader S., Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, *Blood*, 1998, 91 [11], 3995 - 4019.
- [29] Yamada, N., Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase- 1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 66, 187- 195. [Erratum published in *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 68, 1542].
- [30] Bach FH Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wien Klin Wochenschr.* 2002,114 Suppl 4,1-3.
- [31] Deshane J, Wright M, Agarwal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol.* 2005, 52[2], 273-84.
- [32] Wang C, Chau LY. Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Chang Gung Med J.* 2010, 33[1], 13-24.
- [33] Hjortsø MD, Andersen MH. The expression, function and targeting of haem oxygenase-1 in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2014, 14[4], 337-47.
- [34] Lin X, Fang Q, Chen S, Zhe N, Chai Q, Yu M, Zhang Y, Wang Z, Wang J. Heme oxygenase-1 suppresses the apoptosis of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway. *Leuk Res.* 2015, 39[5], 544-52.
- [35] Barrera LN, Rushworth SA, Bowles KM, MacEwan DJ. Bortezomib induces heme oxygenase-1 expression in multiple myeloma. *Cell Cycle.* 2012, 11[12], 2248-52.
- [36] Rueda B., 'HO-1 Promoter Polymorphism Associated with Rheumatoid Arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 2007, 56, 3953-58.
- [37] Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, et al. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet.* 2002;111, 1-8.

Synteza funkcjonalnych nanocząstek magnetycznych, charakterystyka spektroskopowa oraz ocena potencjalnego zastosowania w procesie oczyszczania białek

Przemysław Dutka, Alicja Karabas, Anna Kluza, Rafał Piwowarczyk, Anna Salerno-Kochan, Łukasz Strzelec

Koło Naukowe Studentów Biochemii „N.zyme”, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

annakluza@yahoo.com

Praca napisana pod opieką: dr hab. Ibeth Guevara-Lora

Nanocząstki magnetyczne, dzięki swoim specyficznym właściwościom, takim jak superparamagnetyzm oraz znaczny stosunek powierzchni do objętości, od kilkudziesięciu lat przyciągają uwagę szerokiego grona naukowców. Dzięki łatwej i taniej produkcji oraz szybkości procesu ich separacji pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego, stanowią one ciekawy obiekt do licznych badań i zastosowań w biotechnologii. Opracowano wiele metod mających na celu funkcjonalizację nanocząstek magnetycznych poprzez modyfikacje powierzchni celem nadania im nowych właściwości.

**Głównym celem autorów była synteza nanocząstek magnetycznych oraz ich chemiczna modyfikacja jonami Ni^{2+} przy pomocy kwasu nitrylotrioctowego (NTA, ang. nitrilotriacetic acid), umożliwiającą wiązanie do ich powierzchni białek posiadających tzw. metkę histydynową. Syntezę nanocząstek magnetycznych z Fe_3O_4 przeprowadzono metodą strącenio-
wą, następnie dokonano ich silanizacji za pomocą odczynnika APTES (ang. (3-aminopropyl)triethoxysilane). Otrzymane nanocząstki scharakteryzowano za pomocą pomiarów FT-IR oraz DLS. Następnie powierzchnię nanocząstek aktywowano poprzez immobilizację NTA oraz EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) za pomocą odczynnika EDC (ang. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) oraz sulfo-NHS (ang. sulfo-N-hydroxysuccinimide). Tak przygotowane nanocząstki zastosowano jako złożę chromatograficzne podczas oczyszczania białka MSP (ang. Membrane Scaffold Protein) posiadającego metkę histydynową, oceniając ich zdolność do wyłapywania białka z roztworu. Na silanizowanych nanocząstach, za pomocą odczynników EDC i NHS, immobilizowano również NHS-biotynę oraz biotynylowaną albuminę wołową. Zmodyfikowane w ten sposób nanocząstki wykazały zdolność wiązania streptawidyny. Możliwość wiązania białka potwierdzono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Uzyskane rezultaty wykazały możliwość zastosowania funkcjonalnych nanocząstek do oczyszczania białek.**

Wstęp

Termin „nanocząstki” odnosi się do materiałów, których co najmniej jeden z wymiarów zawiera się w przedziale od 1 do 100 nm. Nanocząstki magnetyczne są podklasą tej grupy, charakteryzującą się dodatkowo odpowiedzią na zastosowane zewnętrzne pole magnetyczne. Poniżej pewnej krytycznej objętości, charakterystycznej dla użytego materiału, każda nanocząstka zaczyna stanowić pojedynczą magnetyczną domenę, dzięki czemu wykazuje własności superparamagnetyczne. Magnetyczne właściwości nanocząstek mogą być kontrolowane poprzez zmianę rozmiaru, kształtu lub składu syntetyzowanych cząstek. Wraz ze spadkiem rozmiaru nanocząstki wzrasta jej stosunek powierzchni do objętości - powierzchnię nanocząstki o średnicy 6 nm buduje około 20% wszystkich atomów tej struktury. Ta wysoka wartość jest przyczyną występowania wielu unikalnych dla nanocząstek cech, które nie są obserwowane dla materiałów o większych objętościach. Przykładem odmiennych właściwości chemicznych jest zmiana wytrzymałości mechanicznej oraz twardości materiału [1]. Wysoka wartość stosunku powierzchni do objętości jest również przyczyną obecności wysokiej energii powierzchniowej. Podczas syntezy, nieopłaszczone nanocząstki wykazują tendencję do agregacji celem zminimalizowania energii powierzchniowej, co powoduje, iż synteza nanocząstek o wąskim zakresie średnicy jest niemałym wyzwaniem. Kolejnym problemem wynikającym z dużego stosunku powierzchni do objętości jest wysoka re-

aktywność chemiczna metalicznych nanocząstek. Nieopłaszczone nanocząstki nie są stabilne w standardowych warunkach, łatwo ulegają agregacji, utlenieniu do Fe_2O_3 , czy też rozтворzeniu w roztworach o pH kwaśnym. W związku z tym obserwowany jest ciągły rozwój metod prowadzących do nadania nanocząstkom stabilności chemicznej, jednolitej wielkości oraz dobrego rozproszenia w docelowym rozpuszczalniku. Jedną z najprostszych praktyk jest modyfikacja ich powierzchni poprzez immobilizację lizyny lub kwasu glutaminowego.

W przeciągu ostatnich lat wiele prac badawczych zostało poświęconych rozwojowi metod syntezy nanocząstek, pozwalających równocześnie na kontrolę rozmiaru, kształtu oraz składu powstających produktów. Do najbardziej popularnych należą: współstrącanie, rozkład termiczny, synteza hydrotermiczna oraz synteza sonochemiczna [2-5]. Powszechnie stosowaną metodą wytwarzania nanocząstek z tlenków żelaza jest metoda współstrącania z wodnych roztworów soli żelaza. Praktyka ta polega na mieszanii soli żelaza trójwartościowego oraz żelaza dwuwartościowego w zasadowym środowisku oraz atmosferze gazu obojętnego. Poprzez zmianę stosunków molowych mieszanych jonów, rodzaju wykorzystanych soli, temperatury w jakiej przebiega reakcja oraz pH środowiska, możliwa jest kontrola rozmiaru oraz kształtu otrzymywanych nanocząstek [6]. Wadą opisaney metody jest znaczna polidispersyjność otrzymanych nanocząstek, przez co w obrębie synteżatu cechują się one

niejednorodnym zachowaniem pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego.

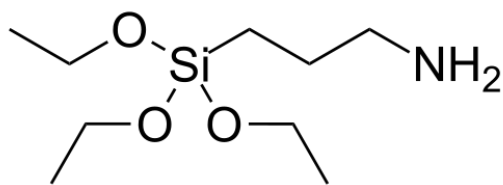
Kluczowym czynnikiem dla zastosowania nanocząstek jest obecność odpowiednich grup funkcyjnych lub całych molekuł na powierzchni. Umieszczone już w trakcie syntezy związki mogą zostać wykorzystane do dalszej funkcjonalizacji nanocząstek, na przykład przez zastosowanie sieciowania chemicznego wyeksponowanych reszt z makromolekułami [7]. Różnorodność dostępnych czynników sieciujących pozwala na połączenie grup reaktywnych różnego typu. Powszechnie wykorzystywanymi czynnikami sieciującymi są: karbodiimidy łączące grupę karboksylową z aminową, estry NHS i sulfo-NHS tworzące wiązanie z grupą aminową, maleimidy tworzące wiązanie z grupami tiolowymi oraz glutaraldehyd pozwalający na połączenie dwóch grup aminowych [7-9]. Jedną z często stosowanych metod funkcjonalizacji jest silanizacja. Jest to technika polegająca na opłaszczaniu nanocząstek związkami zawierającymi krzem, takimi jak krzemionka (SiO_2) lub trialkoksylanopropan. Przykładami

związków stosowanych do silanizacji są 3-aminopropylotrietoksylan (APTES, Rys.1), 3-aminopropylotrimetoksylan (APTMS) oraz 3-merkaptopropylotrietoksylan (MPTES). Proces silanizacji pozwala na uzyskanie nanocząstek z wyeksponowanymi na powierzchni grupami aminowymi, które następnie mogą zostać wykorzystane do dalszej modyfikacji [10-13].

Funkcjonalizacja nanocząstek bardzo często wykorzystywana jest do immo-

bilizacji na powierzchni nanocząstek makromolekuł, takich jak białka, peptydy, kwasy nukleinowe, lipidy czy cukry, co niesie za sobą szerokie możliwości aplikacyjne [14]. Występują cztery klasyczne strategie przyłączania makromolekuł do powierzchni nanocząstek, są to: ligandopodobne wiązanie na zasadzie chemisorpcji wykorzystujące np. grupy tiolowe, adsorpcja elektrostatyczna dodatnio naładowanych makromolekuł do ujemnie naładowanego rdzenia nanocząstki (lub odwrotnie), wytworzenie wiązania kowalencyjnego z wykorzystaniem grup funkcyjnych oraz wytworzenie wiązania niekowalencyjnego na zasadzie powinowactwa chemicznego [7].

Technikami bazującymi na powinowactwie chemicznym są system biotyna-awidyna (streptawidyna) oraz oddziaływanie białek zawierającym metkę polihistydynową z kompleksami Ni-NTA immobilizowanymi na nanocząstkach. Oddziaływanie biotyna-awidyna jest jednym z najsilniejszych występujących w przyrodzie. Wytworzone wiązanie niekowalencyjne między awidyną, a biotyną jest bardzo stabilne, odporne na ostre warunki chemiczne oraz wysoką temperaturę. Możliwe jest unieruchomienie cząsteczki awidyny lub streptawidyny na powierzchni nanocząstki poprzez sieciowanie che-



Rys. 1. APTES, związek często stosowany w silanizacji nanocząstek.

miczne, a następnie dołączenie bioty-
nylowanych makromolekuł, jak również
zastosowanie immobilizacji biotyny na
nanocząstkach [15]. Białka zawierające
na N- lub C-końcu (znacznie rzadziej
wewnątrz łańcucha aminokwasowego)
sześć lub więcej powtórzeń histydyny
silnie i specyficznie oddziałują z jonami
niklu lub innymi jonami dwuwartościo-
wymi immobilizowanymi na nanocząst-
kach poprzez kompleks chelatacyjny na
przykład z NTA. Tego typu oddziaływa-
nie znalazło szerokie zastosowanie w
oczyszczaniu białek rekombinowanych
po ich syntezie w różnych systemach
ekspresyjnych [16-18].

Uzyskane nanocząstki można zobrazo-
wać przy użyciu technik takich jak:
transmisyjna mikroskopia elektronowa,
mikroskopia sił atomowych czy skanin-
gowa mikroskopia tunelowa [19, 20].
Obrazy nanocząstek dostarczają wielu
cennych informacji m.in. o rozmiarze i
kształcie nanocząstek lub tylko ich
rdzenia, a zastosowanie komputero-
wych metod statystycznych pozwala
określić średni rozmiar, jak i rozkład
zmienności kształtu. Jednak surowe
warunki, jakim poddawane są nano-
cząstki przy przygotowywaniu próbek
do obrazowania tymi metodami, mogą
powodować ich agregację. Ponadto nie
nadają się do badania nanocząstek w
roztworach. W zawieszeniu w roztwo-
rze nanostruktury można szybko scha-
rakteryzować pod kątem ich
rozmiarów, korzystając ze zjawiska dy-
namicznego rozpraszania światła
(DLS). U podstaw tej metody leży ob-
serwacja fluktuacji intensywności roz-
proszonego światła. Na wartość tych
fluktuacji wpływ mają ruchy Browna

oraz dyfuzja cząsteczek. Wykorzystując
relacje Stokesa-Einsteina można okre-
ślić promień hydrodynamiczny czą-
steczki w oparciu o wartość dyfuzji
translacyjnej. Widma nanocząstek w
podczerwieni (absorbcyjno-emisyjne)
uzyskuje się korzystając z techniki fo-
urierowskiej spektroskopii w podczer-
wieni (FT-IR). Metoda ta pozwala na
szybką i wydajną identyfikację funkcjo-
nalnych nanocząstek opłaszczonych
substratem, przy użyciu stosunkowo
niedrogiej aparatury [21, 22].

Nanocząstki magnetyczne poza wyko-
rzystaniem w oczyszczaniu białek,
znajdują także liczne zastosowanie w
biomedycynie, obrazowaniu komórek
nowotworowych, jako nośniki leków
przeciwnowotworowych [23, 24], a
także w ochronie środowiska, gdzie
wykorzystywane są do oczyszczania
oraz neutralizacji substancji szkodli-
wych - jak na przykład w remediacji
zanieczyszczeń gleby [25, 26]. Szczegół-
nie interesujące wydają się bioche-
miczne możliwości wykorzystania
nanocząstek magnetycznych podda-
nych funkcjonalizacji powierzchni.
Niedawno opublikowane informacje
donoszą, że nanomateriały zbudowa-
ne między innymi z Fe_3O_4 mają ak-
tywność katalityczną zbliżoną do
peroksydazy, w wyniku czego zapropo-
nowano ich wykorzystanie w kolory-
metrycznym oznaczeniu nadtlenu
wodoru oraz glukozy [27]. Często uży-
wane do tego oznaczenia enzymy po-
siadają szereg wad związanych z
możliwością ich denaturacji w nieko-
rzystnych warunkach, inhibicji czy też
dezaktywacji pod wpływem działania
proteaz. Podczas gdy nanomateriały są

wysoce stabilne w trudnych warunkach, ich otrzymanie jest znacząco łatwiejsze, jednocześnie wykazują wysoką efektywność [28].

Część eksperymentalna

Nanocząstki magnetyczne charakteryzują się prostotą i niskim kosztem wykonania. Mogą one być łatwo modyfikowane w celu nadania nowych funkcji i bez trudu dostosowywane do potrzeb naukowca w zależności od projektowanych doświadczeń.

Celem autorów było opracowanie nanocząstek magnetycznych Fe_3O_4 , które mogą zostać wykorzystane jako złożone chromatograficzne w procesie oczyszczania białek posiadających powtórzenia reszt histydynowych. Aby to osiągnąć przeprowadzono silanizację nanocząstek przy użyciu odczynnika APTES, a następnie podjęto próby funkcjonalizacji ich powierzchni poprzez immobilizację kwasów NTA oraz EDTA. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na otrzymanie nowego materiału, stanowiącego tańszą alternatywę dla powszechnie używanych złóż komercyjnych. Zoptymalizowana silanizacja nanocząstek magnetycznych nie tylko zabezpiecza rdzeń otrzymanych nanocząstek przed degradacją, ale również otwiera wiele potencjalnych możliwości dalszej modyfikacji ich powierzchni.

Równolegle przeprowadzono immobilizację biotyny oraz biotynylowanej albuminy wołowej na powierzchni nanocząstek. Efektywność procesu sprawdzono poprzez ocenę zdolności funkcjonalizowanych nanocząstek do oddziaływania ze streptawidyną.

Charakterystyki nanocząstek dokonano

przy użyciu spektroskopii fourierowskiej (FT-IR) oraz techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Zdolność wiązania białek przez funkcjonalizowane nanocząstki analizowano przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE.

Metody

Synteza nanocząstek magnetycznych

Synteza nanocząstek magnetycznych przebiegała następująco: 5,83g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oraz 2,15g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (stosunek molowy 2:1) rozpuszczono w 200 ml wody w atmosferze beztlenowej w temperaturze równej 80°C , intensywnie mieszając. Dodawano kroplami 25% amoniak aż do osiągnięcia pH równego 9. Po półgodzinnej syntezie nanocząstki przepłukano wodą do momentu uzyskania obojętnego pH.

Silanizacja nanocząstek magnetycznych

W celu funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek, przeprowadzono ich silanizację za pomocą odczynnika APTES, w wyniku której na powierzchni otrzymano grupę aminową ($-\text{NH}_2$), umożliwiającą dalsze modyfikacje. Nanocząstki (0,5 g) poddano mieszanin w 4% roztworze odczynnika APTES oraz 5% glicerolu przez 2 godziny w temperaturze 90°C (Rys. 2).

Charakterystyka otrzymanych nanocząstek magnetycznych

W celu charakterystyki modyfikacji otrzymanych nanocząstek wykonano pomiary FT-IR. Nanocząstki wysuszone pod ciśnieniem 7 mTr, a następnie przygotowano pastylkę ze szczyptą badanych próbek oraz 0,2 g KBr. Pomiary przeprowadzono na spektrometrze FT-IR Nicolet 380 IR (Thermo Electron Corporation, USA) w zakresie liczb fa-

lowych od 400 cm⁻¹ do 40000 cm⁻¹, zbierając dane co 4 cm⁻¹.

Wykonano również analizę rozkładu wielkości populacji nanocząstek magnetycznych metodą DLS. Przed pomiarem zawiesinę nanocząstek rozpuszczano w buforze PBS zawierającym 50% glicerol, w stosunku 1:1000 w celu opóźnienia opadania próbek przed pomiarem. Każdorazowo przed pomiarem próbkę odgazowywano przez 5 min przy pomocy pompy próżniowej. Pomiary DLS wykonywane były z wykorzystaniem aparatu DynaPro-MS800 (Protein Solutions Inc.) zgodnie z parametrami zebranymi w tabeli 1.

Funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek magnetycznych

W czasie dalszych doświadczeń wykorzystywano biotynyłowaną albuminę wołową (bt-BSA), otrzymaną następująco: 4 mg BSA rozpuszczono w 2 ml 20 mM buforu węglanowego o pH 8,3, po czym dodano dwudziestokrotny nadmiar NHS-biotyny rozpuszczonej w DMSO. Po trzech godzinach inkubacji na łaźni lodowej roztwór dializowano przez noc względem 10 mM buforu HEPES o pH 7,4 w temperaturze 4oC.

W celu funkcyjalizacji silanizowanych nanocząstek magnetycznych zastosowano cztery strategie (Rys. 3).

(1) Do trzech porcji 50 mg nanocząstek dodano 1 ml roztworu EDC o stężeniu 20 mg/ml oraz 1 ml związku immobilizowa-

nego lub białka (20 mg/ml NTA, 20 mg/ml EDTA, bt-BSA o stężeniu 1 mg/ml). Reakcję przeprowadzano przez pięć godzin w 0,1 M buforze MES o pH 6,3.

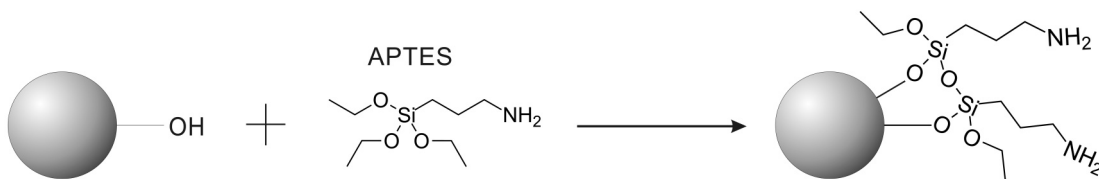
(2) 50 mg nanocząstek zawieszono w 10% roztworze glutaraldehydu w 10 mM buforze HEPES o pH 7,4 i inkubowano przez dwie godziny, ciągle mieszając. Po zadanym czasie nanocząstki przepłukano pięciokrotnie wodą, po czym dodano 5 ml 10 mM buforu HEPES o pH 7,4 oraz 0,8 ml roztwór 2 mg/ml bt-BSA. Inkubowano dalsze dwie godziny, ciągle mieszając.

(3) 1 mg NHS-biotyny rozpuszczono w 30 µl DMSO, po czym dodano do 50 mg nanocząstek zawieszonych w 1 ml buforu PBS o pH 8,4. Inkubowano na lodzie przez trzy godziny, ciągle mieszając.

(4) 5 mg EDC rozpuszczono w 1 ml roztworu zawierającego 50 mg sulfo-NHS oraz (a) 5 mg NTA, (b) 5 mg EDTA, (c) 1,4 mg bt-BSA w 0,1 M buforze MES o pH 6,3. Po półgodzinnej inkubacji do mieszaniny dodano po 4 ml buforu PBS o pH 8,4, zawierającego po 50 mg nanocząstek.

Czas akwizycji	10 s
Próg sygnał/szum	1,5
Czułość/moc lasera	50-100% ⁽¹⁾
Temperatura modułu zliczania fotonów	4°C
Temperatura komory pomiarowej	20°C

Tab.1. Parametry dla pomiarów DLS. (1) Wyższa moc lasera daje lepszą dokładność pomiarów, ale zwiększa zakłócenia pochodzące od zanieczyszczeń takich jak kurz.



Rys. 2. Schemat silanizacji.

Oczyszczanie białek za pomocą uzyskanych nanocząstek

Do nanocząstek z immobilizowaną na powierzchni białka BSA dodano po 100 µg streptawidyny w 1,5 ml buforu PBS o pH 7,4. Po całkowitej inkubacji nanocząstki przepłukano pięciokrotnie buforem PBS o pH 7,4, po czym eluowano streptawidynę poprzez denaturację w 95°C. Analizę rezultatów przeprowadzono wykorzystując technikę SDS-PAGE.

W celu osiągnięcia pełnej funkcjonalności nanocząstek opłaszczonych NTA oraz EDTA przeprowadzono ich 20-minutową inkubację w roztworze NiCl_2 , nanocząstki następnie dokładnie przepłukano, po czym do próbek dodano po 100 µg białka MSP z metką histydynową. Po całkowitej inkubacji mieszaninę nanocząstek przepłukano pięciokrotnie 40 mM buforem Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 1% Triton o pH 8,0, po czym eluowano białko 40 mM buforem Tris-HCl zawierającym 0,3 M NaCl oraz 0,5 M imidazol o pH 8,0. Analizę rezultatów przeprowadzono wykorzystując technikę SDS-PAGE.

Wyniki i dyskusja

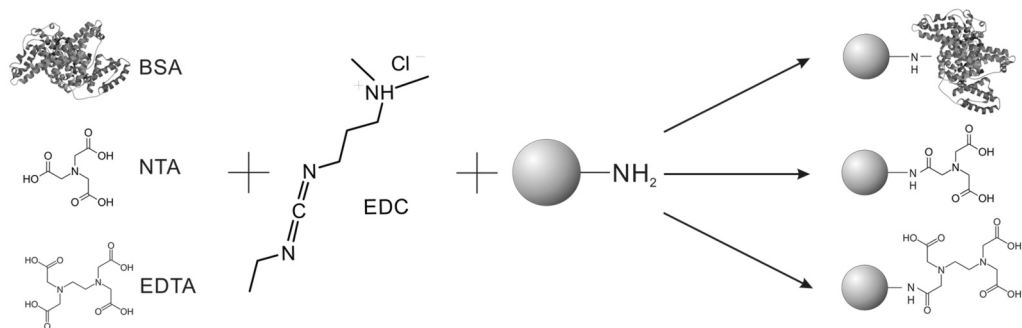
Analiza metodą DLS wykazała, iż uzyskano preparat nanocząstek, w którym widoczne są trzy populacje (przypuszczalnie wynikające z agregacji nanocząstek bez istotnego ładunku powierzchniowego), pierwsza o średniej średnicy hydrodynamicznej $d_h = 67,01$ nm, druga $d_h = 569,2$ nm i trzecia $d_h = 5169$ nm, polidispersja układu 1. Nanocząstki magnetyczne po reakcji silanizacji charakteryzują się średnią średnicą hydrodynamiczną po-

pulacji równą $d_h = 251,3$ nm, natomiast polidispersja wynosi 0,257 (Rys. 4).

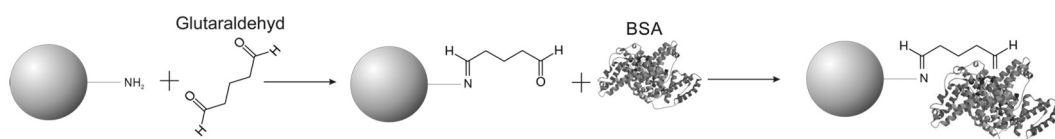
Silanizację nanocząstek odczynnikiem APTES potwierdzono za pomocą pomiarów spektroskopii FT-IR, wyniki zostały znormalizowane, a następnie przedstawione jako procent transmittancji (Rys. 5). Zgodnie z dostępną literaturą, pasma pochodzące od samych nanocząstek, to pasma o liczbie falowej wynoszącej około 580 cm^{-1} (Fe-O), 3400 cm^{-1} (O-H). Pasma w okolicy 2400 cm^{-1} może wskazywać na zanieczyszczenie próbek (C-O). Pasma wskazujące na efektywną silanizację to 900 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} (Si-O), 3400 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} (N-H), 2800 cm^{-1} (C-H) – wszystkie pochodzące od odczynnika APTES. Niektóre maksyma pasm nakładają się na siebie, uniemożliwiając bezspeczne stwierdzenie na podstawie widm FT-IR obecności pewnych grup funkcyjnych [21-22].

Wyniki oczyszczania białek za pomocą uzyskanych nanocząstek magnetycznych zaprezentowano za pomocą obrazów elektroforezy SDS-PAGE (Rys. 6). Zgodnie z oczekiwaniami na żelu przedstawiającym wyniki wiązania streptawidyny do nanocząstek widoczny jest monomer streptawidyny o masie cząsteczkowej ok. 13,2 kDa. We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach udało się uzyskać wiązanie streptawidyny do funkcjonalizowanych nanocząstek. Najgrubszy prążek pochodzi z wiązania streptawidyny z zastosowaniem nanocząstek, na których immobilizowano białko BSA za pomocą obu odczynników – EDC oraz NHS. Zgodnie z danymi lite-

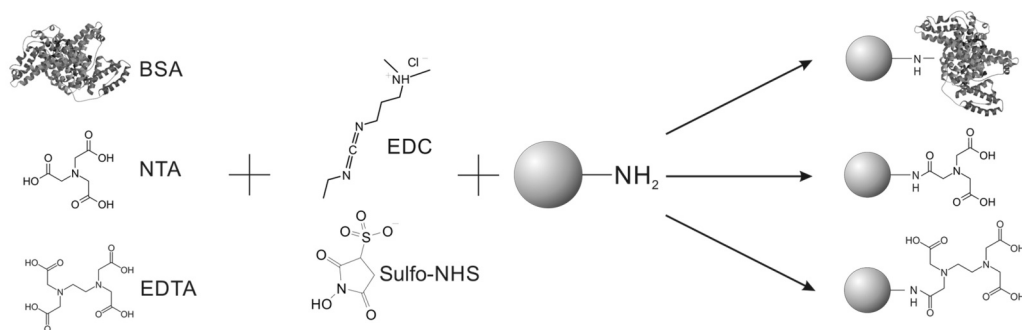
(1)



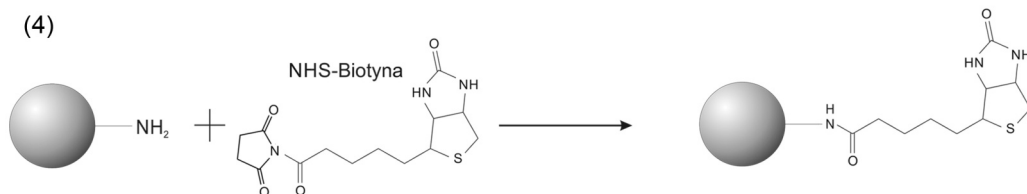
(2)



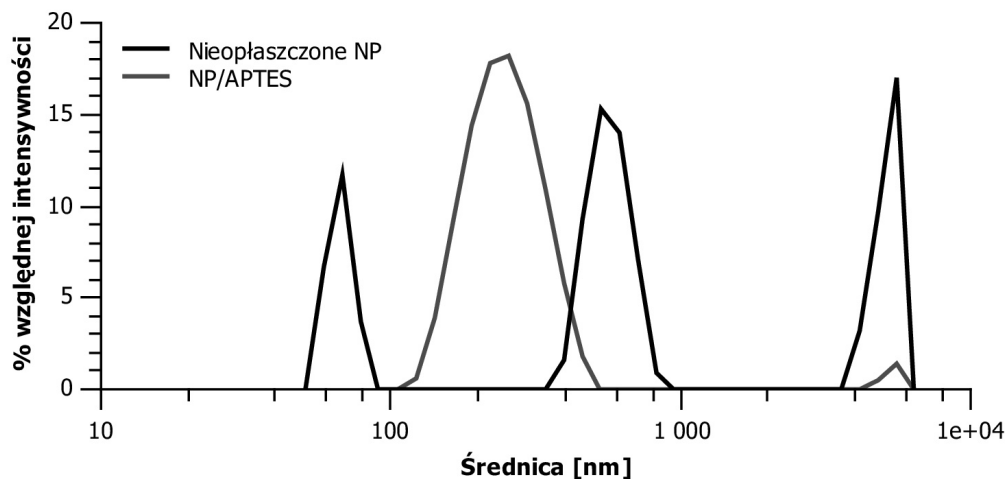
(3)



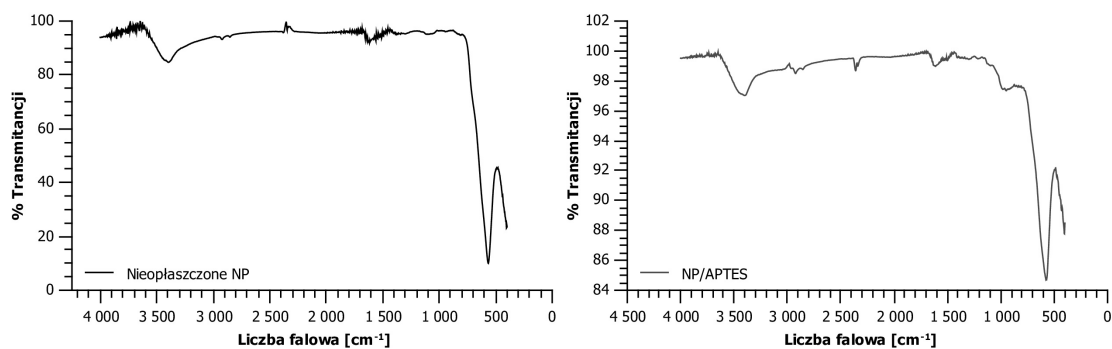
(4)



Rys. 3. Strategie funkcjonalizacji nanocząstek (opis w tekście).



Rys. 4. Wyniki analizy nanocząstek metodą DLS.

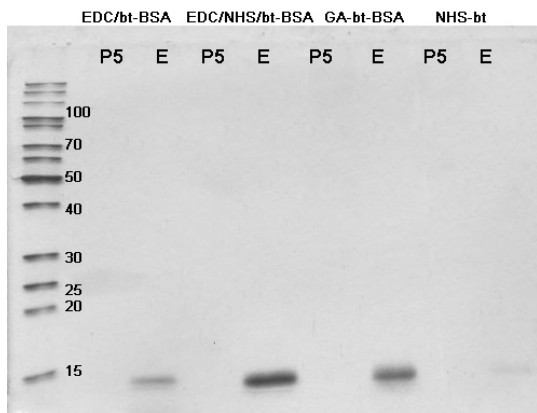


Rys. 5. Widma FT-IR otrzymanych nanocząstek.

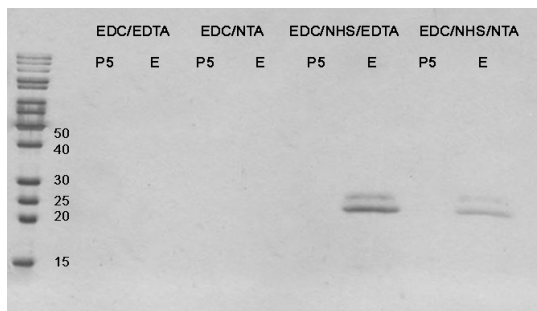
ratorowymi dodatek NHS do reakcji wiążącej wybrane molekuly za pomocą EDC zwiększa wydajność immobilizacji [29]. Uzyskane wyniki stoją w zgodzie z tym twierdzeniem. Ze względu na odmienne warunki reakcyjne niemożliwe jest porównanie wyników immobilizacji EDC/NHS z immobilizacją z zastosowaniem glutaraldehydu.

Na żelu prezentującym wyniki po wiązaniu białka MSP zaobserwować można prążek na wysokości 25 kDa, odpowiadającej masie cząsteczkowej białka MSP (25,3 kDa) (Rys. 7). Zarówno przy immobilizacji NTA, jak i EDTA nie zaobserwowano wiązania białka MSP do nanocząstek, w przypadku immobilizacji w których zastosowano je-

dynie odczynnik EDC. Chociaż metoda ta zadziałała w wiązaniu białka, nie odniosła sukcesu w przypadku mniejszych ligandów jakimi są wybrane związki chelatujące. Interesującą obserwację stanowi fakt, iż nanocząstki z immobilizowanym EDTA były w stanie wiązać więcej MSP niż nanocząstki z immobilizowanym NTA - pomimo wcześniejszych przewidywań opierających się na budowie komercyjnie dostępnych produktów. Warto jednak zauważyć, iż w produktach komercyjnych często występuje zmodyfikowana forma NTA, wzbogacona np. o grupę aminową przyłączoną do związku za pomocą łącznika alkilowego. W przypadku zastosowanej przez autorów



Rys. 6. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego prezentujące wyniki po wiązaniu streptawidyny do nanocząstek z immobilizowaną na powierzchni bt-BSA. P5 - piąte płukanie, E - elucja, EDC/bt-BSA - próbka otrzymana po immobilizacji bt-BSA za pomocą EDC, EDC/NHS/bt-BSA - próbka otrzymana po immobilizacji bt-BSA za pomocą EDC i NHS, GA-bt-BSA - próbka otrzymana po immobilizacji bt-BSA za pomocą glutaraldehydu, NHS-bt - próbka otrzymana po immobilizacji NHS-biotyny.



Rys. 7. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego przedstawia wyniki wiązania białka MSP do nanocząstek z immobilizowanym na powierzchni NTA oraz EDTA. P5 - piąte płukanie, E - elucja, EDC/EDTA - próbka otrzymana po immobilizacji EDTA za pomocą EDC, EDC/NTA - próbka otrzymana po immobilizacji NTA za pomocą EDC, EDC/NHS/EDTA - próbka otrzymana po immobilizacji EDTA za pomocą EDC i NHS, EDC/NHS/NTA - próbka otrzymana po immobilizacji NTA za pomocą EDC i NHS.

strategii immobilizacji, w wiązaniu NTA wykorzystana została jedna z jego grup karboksylowych, w skutek czego tylko dwie z trzech mogły zostać zastosowane do wiązania jonów niklu. W

przypadku EDTA zubożenie wiązania skutkowało obniżeniem liczby grup karboksylowych z czterech do trzech, tym samym otrzymując związek NTA-podobny [16-18]. Zastosowana strategia pozwoliła znacznie obniżyć koszty produkcji nanocząstek, zamieniając kosztowny NTA z dodatkowymi grupami odpowiadającymi za immobilizację na tani i łatwo dostępny EDTA.

Podsumowanie

W trakcie projektu udało się zsyntetyzować nanocząstki magnetyczne, przeprowadzono ich silanizację oraz funkcjonalizację, immobilizując NTA, EDTA oraz bt-BSA. Dokonano charakterystyki uzyskanych nanocząstek za pomocą spektroskopii FT-IR oraz metody DLS, kolejno potwierdzając silanizację nanocząstek oraz określając ich wielkość. Wykazano, że jest możliwe oczyszczanie białek z metką histydynową za pomocą nanocząstek z NTA oraz EDTA na przykładzie MSP. Stwierdzono również wiązanie streptawidyny do nanocząstek z immobilizowaną bt-BSA. Użyte nanocząstki, po optymalizacji procesu oczyszczania, mogą być tanią alternatywą dla komercyjnych produktów, umożliwiającą dostosowanie do konkretnych potrzeb naukowca.

Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Rady Kół Naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz środków Koła Naukowego Studentów Biochemii „N.zyme”. Szczególne podziękowania kierujemy w stronę dr hab. Ibeth Gu-

evara-Lora, dr. inż. Cezarego Czosnka, prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej, dr. Andrzeja Góreckiego oraz

mgr. Piotra Stępnia za udostępnienie laboratoriów wydziałowych oraz cenną pomoc merytoryczną.

Bibliografia:

- [1] Issa, B., Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14, 21266-21305
- [2] Lu, A., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2007, 46(8), 1222-1244
- [3] Wu, W., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Research Letters*, 2008, 3(11), 397-415
- [4] Suslick, K., Sonochemistry, *Science*, 1990, 247(4949), 1439-1445
- [5] Vijayakumar, R., Sonochemical Synthesis and Characterization of Pure Nanometer-Sized Fe₃O₄ Particles, *Materials Science and Engineering*, 2000, A286, 101-105
- [6] Andrade, A., pH effect on the synthesis of magnetite nanoparticles by the chemical reduction-precipitation method, *Química Nova*, 2010, 33(3), 524-527
- [7] Crosslinking Technical Handbook, Thermo Scientific, USA, 2009
- [8] Migneault, I., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, 2004, 37, 790-802
- [9] Barbosa, O., Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Advances*, 2014, 4, 1583-1600
- [10] El-Gamel, N., SiO₂@Fe₂O₃ core-shell nanoparticles for covalent immobilization and release of sparfloxacin drug, *Chemical Communications*, 2011, 47, 10076-10078
- [11] Mashhadizadeh, M., Drug-Carrying Amino Silane Coated Magnetic Nanoparticles as Potential Vehicles for Delivery of Antibiotics, *Nanomedicine & Nanotechnology*, 2012, 3(4), 1-7
- [12] Yamaura, M., Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 279, 210-217
- [13] Khatiri, R., Preparation and characterization of Fe₃O₄/SiO₂/APTES core-shell nanoparticles, 4th International Conference on Nanostructures, 2012, 1456-1458
- [14] Can, K., Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71, 154-159
- [15] Avidin-Biotin Technical Handbook, Thermo Scientific, USA, 2009
- [16] Mohapatra, S., Design of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Purification of Histidine-Tagged Recombinant Proteins, *NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, 2007, 2, 291-294
- [17] Lee, K., Decoration of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with Ni²⁺: agent to bind and separate histidine-tagged proteins, *Chemical Communications*, 2008, 709-711
- [18] Xu, C., Nitritoltri-acetic Acid-Modified Magnetic Nanoparticles as a General Agent to Bind Histidine-Tagged Proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 3392-3393
- [19] Thanh, N., Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today*, 2010, 5, 213-230
- [20] Sperling, R., Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles, *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 2010, 368(1915), 1333-1383
- [21] Radu, G., Use of the fourier transform infrared spectroscopy in characterization of specific samples, *UPB Scientific Bulletin*, 2012, 74(4), 1454-2331
- [22] Casillas, P., Infrared spectroscopy of functionalized magnetic nanoparticles, *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, 2012, 21, 405-420
- [23] Masthoff, I., Functionalization of magnetic nanoparticles with high-binding capacity for affinity separation of therapeutic proteins, *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 16(1), 2163-2173
- [24] Pan, Y., Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells, *Chemical Society Reviews*, 2012, 41, 2912-2942
- [25] Chang, M., Remediation of pyrene-contaminated soil by synthesized nanoscale zero-valent iron particles, *Journal of environmental science and health: part A, toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 2009, 44(6), 576-582
- [26] Tang, S., Magnetic nanoparticles: essential factors for sustainable environmental applications, *Water Research*, 2013, 47(8), 2613-2632
- [27] Wei, H., Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection, *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6), 2250-2254
- [28] Beveridge, J., The use of magnetic nanoparticles in analytical chemistry, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2011, 4, 251-273
- [29] Fisher, M., Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach, *Methods in Molecular Biology*, 2010, 627, 55-73